Principais temas da pesquisa em
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS 2
Edson da Silva
(Organizador)
Atena
Editora
Ano 2023

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS 2

Edson da Silva
(Organizador)

Atena
Editora
Ano 2023

Principais temas da pesquisa em ciências biológicas 2

Diagramação: Camila Alves de Cremo
Correção: Soellen de Britto
Indexação: Amanda Kelly da Costa Veiga
Revisão: Os autores
Organizador: Edson da Silva

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

P957 Principais temas da pesquisa em ciências biológicas 2 / Organizador Edson da Silva. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2023.

Formato: PDF
Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader
Modo de acesso: World Wide Web
Inclui bibliografia
ISBN 978-65-258-1345-5
DOI: https://doi.org/10.22533/at.ed.455230905

1. Ciências biológicas. I. Silva, Edson da (Organizador). II. Título.

CDD 570

Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná – Brasil
Telefone: +55 (42) 3323-5493
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao artigo científico publicado; 2. Declaram que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certificam que os artigos científicos publicados estão completamente isentos de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirmam a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhecem terem informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa; 6. Autorizam a edição da obra, que incluem os registros de ficha catalográfica, ISBN, DOI e demais indexadores, projeto visual e criação de capa, diagramação de miolo, assim como lançamento e divulgação da mesma conforme critérios da Atena Editora.

DECLARAÇÃO DA EDITORA

A Atena Editora declara, para os devidos fins de direito, que: 1. A presente publicação constitui apenas transferência temporária dos direitos autorais, direito sobre a publicação, inclusive não constitui responsabilidade solidária na criação dos manuscritos publicados, nos termos previstos na Lei sobre direitos autorais (Lei 9610/98), no art. 184 do Código Penal e no art. 927 do Código Civil; 2. Autoriza e incentiva os autores a assinarem contratos com repositórios institucionais, com fins exclusivos de divulgação da obra, desde que com o devido reconhecimento de autoria e edição e sem qualquer finalidade comercial; 3. Todos os e-book são *open access, desta forma* não os comercializa em seu site, sites parceiros, plataformas de *e-commerce,* ou qualquer outro meio virtual ou físico, portanto, está isenta de repasses de direitos autorais aos autores; 4. Todos os membros do conselho editorial são doutores e vinculados a instituições de ensino superior públicas, conforme recomendação da CAPES para obtenção do Qualis livro; 5. Não cede, comercializa ou autoriza a utilização dos nomes e e-mails dos autores, bem como nenhum outro dado dos mesmos, para qualquer finalidade que não o escopo da divulgação desta obra.

APRESENTAÇÃO

A coletânea 'Principais Temas da Pesquisa em Ciências Biológicas 2' é uma obra organizada em 06 capítulos, com contribuições de distintas especialidades da área. Os autores trazem dados e discussões oriundas de pesquisas, ensaios teóricos e de experiências vivenciadas em seus projetos acadêmicos, bem como em atuações profissionais no âmbito da biologia e da saúde humana.

Os estudos foram elaborados por pesquisadores universitários e profissionais do México e do Brasil que atuam em várias especialidades, entre elas: Ciências Biológicas; Ciências Agrárias e da Biodiversidade; Bioquímica; Química; Desenvolvimento Sustentável; Ciências Exatas e Desenvolvimento Humano.

Espero que a literatura dessa coletânea multiprofissional contribua com o desenvolvimento científico, a formação universitária e a atuação profissional na esfera da pesquisa nas Ciências Biológicas. Parabenizo os autores e desejo uma ótima leitura a todos vocês!

Edson da Silva

SUMÁRIO

APOE E SEUS PARCEIROS DE INTERAÇÃO NO CONTEXTO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE C: UMA VISÃO INTEGRATIVA VÍRUS-HOSPEDEIRO

Data de submissão: 06/04/2023　　*Data de aceite: 02/05/2023*

Vitória Fernandes de Castro
Universidade Federal Fluminense, Instituto de Biologia, Curso de Ciências Biológicas
Rio de Janeiro - RJ
http://lattes.cnpq.br/1149814064096153

Luiz Mors Cabral
Universidade Federal Fluminense, Instituto de Biologia, Curso de Ciências Biológicas
Rio de Janeiro - RJ
http://lattes.cnpq.br/5525595141868422

Luísa Hoffmann
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Departamento de Biotecnologia
Rio de Janeiro - RJ
http://lattes.cnpq.br/2379740311109634

RESUMO: O vírus da hepatite C (HCV) é o agente etiológico de uma doença infecciosa que tem impacto significante para a saúde pública brasileira e mundial, a hepatite C. O HCV se liga a lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e a lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), formando a partícula lipoviral. Essa associação é necessária para o transporte e etapas do ciclo replicativo do vírus, onde as frações de menor densidade se mostraram mais infecciosas nos estudos. A APOE se faz importante uma vez que está presente em diversas lipoproteínas, como partículas de VLDL, participa do processo de entrada do vírus na célula, na montagem e liberação da partícula viral. Além disso, a APOE também pode camuflar o HCV e ser usada para escape do reconhecimento pelo sistema imunológico do hospedeiro, favorecendo a progressão para a fase crônica. Esta revisão narrativa teve como objetivo agregar conceitos envolvidos na interação entre APOE com HCV, trazendo informações relevantes sobre a estrutura e função da APOE e sua influência sobre o ciclo infeccioso do HCV e evolução da hepatite C nas suas diferentes isoformas. Além disso, abordou e expôs pontos importantes onde APOE e HCV se influenciam, desde fontes de dados e implicações clínicas, possíveis desdobramentos no diagnóstico, prognóstico e tratamento dos pacientes com hepatite C. Toda essa revisão foi realizada tendo como base conhecimentos prévios presentes na literatura.

PALAVRAS-CHAVE: APOE, hepatite C, HCV, interação.

APOE AND ITS INTERACTION PARTNERS IN THE CONTEXT OF HEPATITIS C VIRUS INFECTION: AN INTEGRATIVE VIRUS-HOST VIEW

ABSTRACT: The hepatitis C virus (HCV) is the etiological agent of an infectious disease that has a significant impact on Brazilian and global public health, hepatitis C. HCV binds to low density lipoproteins (LDL) and to very low-density lipoproteins (VLDL), forming the lipoviral particle. This association is necessary for the transport and stages of the virus cycle, where lower density fractions have been shown to be more infectious in the studies. APOE is important since it is present in several lipoproteins, such as VLDL particles, it participates in the process of virus entry into the cell, in the assembly and release of the viral particle. In addition, APOE can also "camouflage" HCV and is used to escape recognition by the host's immune system, favoring progression to the chronic phase. This narrative review aimed to aggregate concepts involved in the interaction between APOE with HCV, bringing relevant information about APOE structure and function, and its influence on the HCV infectious cycle and evolution of hepatitis C in its different isoforms. In addition, has approached and exposed important points where APOE and HCV are influenced, from data sources and clinical implications, possible developments in the diagnosis, prognosis, and treatment of patients with hepatitis C. All this review was carried out based on previous knowledge present in the literature.

KEYWORDS: APOE, hepatitis C, HCV, interaction.

1 I INTRODUÇÃO

De acordo com os dados do Boletim Epidemiológico de Hepatites Virais de 2022, de 2000 a 2021 foram notificados 718.651 casos de hepatites virais no Brasil. Desses, 38,9% são de hepatite C, causada pelo vírus da hepatite C (HCV) (CUNHA *et al.*, 2022). Atualmente foram descritos 8 genótipos de HCV e essa diversidade genética, por sua vez, dificulta o desenvolvimento de vacinas eficazes (BORGIA *et al.*, 2018). No Brasil, há maior prevalência dos genótipos/subtipos de HCV 1a, 1b e 3a (CAMPIOTTO *et al.*, 2005). Além disso, em um mesmo subtipo há subpopulações virais chamadas quasispécies, aumentando a diversidade (SMITH *et al.*, 2014).

Apenas em 1989 identificou-se o HCV como o agente infeccioso responsável por mais de 95% dos casos de hepatite "não-A, não-B" (CHOO *et al.*, 1989; TAKAHASHI *et al.*, 1988). A principal forma de transmissão da hepatite C, pela via parenteral, só foi descoberta em 1992. Outra fonte de transmissão, que era a mais importante até 1993, era a transfusão de sangue. Isso mudou quando a partir de 1993 passaram a fazer testes sorológicos para a detecção do anti-HCV nas bolsas de sangue antes de serem usadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). Além disso, desde 2002 foi incorporado um teste baseado na amplificação de ácidos nucleicos para triagem de sangue, com o objetivo de detectar infecção por HCV e outros agentes etiológicos (KAMEDA; CORRÊA; CASSIER, 2018). Outras formas de transmissão são a via vertical (MILLMAN; NELSON; VELLOZZI, 2017) e sexual (TERRAULT, 2002). Importante ressaltar que pelos dados de 2011 a 2021 em 58,3% dos casos não há

informação da possível fonte de infecção, dificultando a caracterização entre possíveis fontes e mecanismos. Verificou-se que o maior percentual de provável fonte de infecção foi o uso de drogas injetáveis com 27,1% (CUNHA *et al.*, 2022).

Após a infecção se estabelecer inicia-se o desenvolvimento da fase aguda. Nesse período a maioria dos pacientes não apresenta sintomas e o diagnóstico é difícil. A resolução espontânea é rara, uma vez que em cerca de 70%-80% dos casos há evolução para a fase crônica, que é a forma mais grave. Com o passar do tempo e agravamento da situação, pode ocorrer o desenvolvimento de fibrose hepática, podendo evoluir para cirrose (cerca de 15 a 20%) e ainda carcinoma hepatocelular (CHC) (CHEN; MORGAN, 2006; MANNS *et al.*, 2017; VALENTE; FERNANDES; TRINDADE, 2010; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020) (Figura 1).
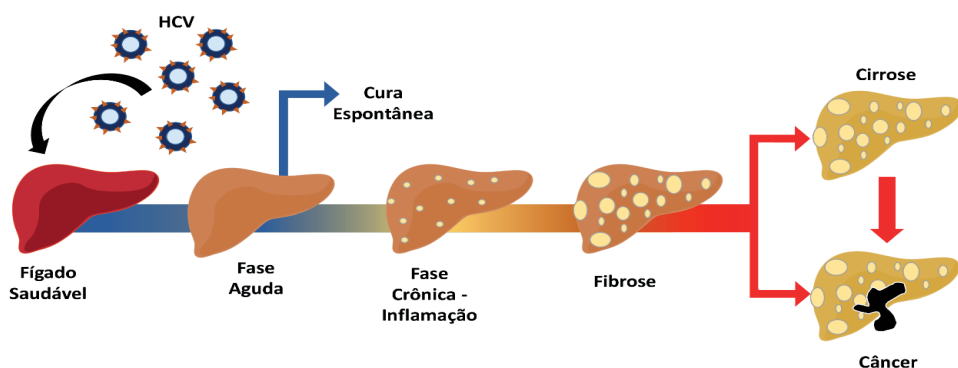
Figura 1: Representação da história natural da infecção pelo HCV.

Fonte: Elaborada pelos autores.

Fatores como coinfecção com vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou vírus da hepatite B (HBV), uso abusivo de álcool e drogas, obesidade, ser do sexo masculino e ter idade mais avançada aumentam as chances do desenvolvimento de um quadro mais agressivo da doença (LUNETTA, A. C. F & LUÍS, 2008; RIBEIRO, 2004), porém este é um processo complexo e multifatorial, ainda em caracterização.

A primeira forma de isolamento das partículas de HCV era obtida de amostras de pacientes crônicos ou de chimpanzés usados em laboratório submetidos a inoculação experimental e estava associada a lipoproteínas (PUMEECHOCKCHAI *et al.*, 2002). O HCV se liga a lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e a lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), formando a partícula lipoviral (LVP). Essa associação é necessária para o transporte e etapas do ciclo replicativo do vírus, onde as frações de menor densidade se mostraram mais infecciosas nos estudos. Essas características são por consequência

da associação das partículas de HCV com os triglicerídeos provenientes da dieta e as apolipoproteínas (APO) (CROUCHET; BAUMERT; SCHUSTER, 2017; POPESCU *et al*., 2014; WRENSCH *et al*., 2018).

A relação entre metabolismo lipídico e infecção por HCV afeta a homeostase como um todo. Na prática clínica é facilmente observada essa relação. Em biópsias de pacientes com hepatite C é notável o comprometimento hepático. Observa-se o aumento das gotículas lipídicas, caracterizando a esteatose (POPESCU *et al*., 2014). O metabolismo lipídico tem papel fundamental no ciclo replicativo do HCV, por isso é uma das principais vias onde proteínas derivadas de genes com mutações se associam com impactos na evolução da doença (D'AVIGDOR *et al*., 2019). Dentre os genes do hospedeiro que poderiam estar associados com a probabilidade de se desenvolver um quadro mais grave ou até mesmo com o sucesso de estabelecimento da infecção pelo HCV, destacam-se aqueles que codificam as apolipoproteínas, por exemplo a APOE.

A APOE se faz importante uma vez que está presente em partículas como de VLDL, de quilomícrons (QM) e de lipoproteína de densidade intermediária (IDL). Além disso, participa do processo de entrada do vírus na célula, na montagem e liberação da partícula viral. Essa proteína também pode "camuflar" o HCV e ser usada para escapar do reconhecimento pelo sistema imunológico do hospedeiro, favorecendo a progressão para a fase crônica. Com o tempo essa associação pode levar o paciente a comorbidades e sérios distúrbios lipídicos, além dos outros problemas já citados intrínsecos à infecção (GONG; CUN, 2019).

Dentro de condições fisiológicas normais, a APOE atua associada a lipoproteínas específicas, regulando o transporte de lipídios e o metabolismo entre o fígado e o tecido periférico, através do reconhecimento de receptores de superfície celular. APOE também tem ação antioxidante e propriedades anti-inflamatórias que modulam o sistema imunológico (DOSE *et al*., 2016; GONG; CUN, 2019). Sua síntese e secreção ocorre principalmente por hepatócitos. No entanto, outras células no cérebro, baço, ovários, rins, músculos, pulmões e até mesmo macrófagos são responsáveis por cerca de 20 a 40% da produção de APOE (ORTH; BELLOSTA, 2012). Os seus variados pontos de produção refletem a vasta influência que essa proteína pode ter na manutenção da homeostase do organismo (MEGALE *et al*., 2016).

Por consequência da sua produção e influência ubíquas, a APOE e suas diferentes isoformas são populares alvos de estudo em diferentes linhas de pesquisa. Vem sendo estudado, por exemplo, sua associação com envelhecimento, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (BAUM *et al*., 2000; GOTTLIEB *et al*., 2011; LEREN *et al*., 1985; MEGALE *et al*., 2016). A APOE, de acordo com as centenas de artigos publicados, é uma proteína de extrema relevância no contexto da infecção pelo HCV. São variados os momentos e aspectos da infecção que diversos experimentos corroboraram a hipótese da APOE ser uma peça-chave para o entendimento e prognóstico da hepatite C. Desde o

momento da entrada do vírus na célula até as consequências mais graves da cronificação, há trabalhos com fortes indícios da influência da APOE (ABONDIO *et al*., 2019; CROUCHET; BAUMERT; SCHUSTER, 2017; GONG; CUN, 2019; MANNS *et al*., 2017; MUELLER *et al*., 2016; NASCIMENTO *et al*., 2020).

Nesse trabalho buscamos agregar conceitos envolvidos na interação da APOE com HCV, trazendo informações relevantes sobre a estrutura e função da APOE, e como essa proteína atua em diferentes vias e é relevante no prognóstico de algumas doenças. Além disso, vamos abordar e expor principalmente pontos importantes onde APOE e HCV se influenciam, desde fontes de dados e implicações clínicas, possíveis desdobramentos no diagnóstico e prognóstico dos pacientes com hepatite C. Toda essa revisão foi feita tendo como base conhecimentos prévios presentes na literatura.

2 | OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo construir uma revisão narrativa compreendendo a APOE e sua relação com a hepatite C.

3 | METODOLOGIA

As fontes de informações usadas foram obtidas por meio de pesquisas nas plataformas *Google*, *Pubmed* e *Scielo*. O referencial teórico dessa revisão é em sua maior parte composta por artigos científicos, além de alguns boletins e *webpages* de órgãos oficiais. As referências foram organizadas no gerenciador *Mendeley*. As palavras-chave utilizadas foram pesquisadas nos idiomas português e inglês e são: APOE; HCV; hepatite C. Inicialmente foi feita uma análise superficial do material obtido para levantamento dos assuntos de maior relevância e organização da estrutura dos temas. Uma vez definida a organização dos temas, foi feita uma busca mais aprofundada para um melhor embasamento teórico dos itens e subitens abordados.

4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Apolipoproteína E: Histórico e características

Entre 1973 e 1974 foi identificada uma APO rica em arginina e associada à VLDL diferente das registradas até aquele momento em humanos (HAVEL; KANE, 1973; SHORE *et al*., 1974). Em 1973, foi descrito uma heterogeneidade dessa proteína, observada em ensaios cromatográficos (SHORE; SHORE, 1973). Em 1975, Utermann e cols. descreveram essa proteína e a nomearam de APOE e conseguiram melhores resultados para o entendimento da heterogeneidade (UTERMANN; JAESCHKE; MENZEL, 1975). Em 1982 foi publicado um trabalho que trazia a sequência completa dessa proteína, com 299 resíduos de aminoácidos e aproximadamente 34 KDa. Junto da análise de sua sequência,

observou-se que alguns exemplares de APOE possuíam diferentes aminoácidos em determinadas posições. Essas variações resultam nas diferentes isoformas da APOE que conhecemos atualmente (NASCIMENTO *et al*., 2020; RALL; WEISGRABER; MAHLEY, 1982; ZANNIS *et al*., 1982).

Em 1981, Zannis e Breslow propuseram um modelo de três alelos para explicar os padrões de faixas múltiplas. Com base na análise do gel de eletroforese 2D com APOE, obtiveram respostas que levaram a um grande avanço na compreensão da base genética dos polimorfismos de APOE. Os três alelos, designados como II, III e IV (hoje conhecidos como APOE ε2, ε3 e ε4, respectivamente), mostraram ter diferentes padrões de corrida em uma eletroforese 2D em gel de poliacrilamida e diferentes pontos isoelétricos. Esses resultados corroboraram com o trabalho de Shore de 1973, que apontou APOE como uma proteína heterogênea (ZANNIS; BRESLOW, 1981).

A APOE não é exclusiva de humanos. Também é encontrada em diversos animais vertebrados, incluindo mamíferos, répteis e peixes (HUEBBE; RIMBACH, 2017). Estudos mostraram que a APOE pertence à família PF01442. Tal família de proteínas é filogeneticamente antiga, com uma origem que vem de antes do surgimento do reino animal, uma vez que seres procarióticos possuem proteínas análogas ao grupo. Assim, vemos que a evolução dessa família vem de antes do ponto da árvore da vida que separa eucariotos e procariotos, corroborando para sua relevância no metabolismo. A família PF01442 é caracterizada como um grupo que possui APOs com diversas repetições de 22 resíduos de aminoácidos que formam um par de alfa-hélices. As proteínas APOA1 e APOA4 são outros exemplos de membros desta família (BABIN *et al*., 1997; THE EUROPEAN BIOINFORMATICS INSTITUTE, [s.d.]; WILSON *et al*., 1991).

O gene da APOE é polimórfico, ou seja, para um mesmo gene existe variantes já fixadas na população. As diferenças entre os alelos podem ocorrer por uma troca de nucleotídeo que irá desencadear um aminoácido diferente em uma determinada posição na proteína. Os três alelos principais da APOE humana são: E2, E3 e E4 (HUEBBE; RIMBACH, 2017; MCINTOSH *et al*., 2012).

O gene *APOE* possui 3.598 nucleotídeos e está localizado no braço longo do cromossomo 19 (19q13.2) dentro do lócus *RELB* em um *cluster* com os genes *APOC1*, *APOC4* e *APOC2* (KEN-DROR *et al*., 2010; NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2021; OLAISEN; TEISBERG; GEDDE-DAHL, 1982). Esse gene possui quatro éxons no total, onde no éxon 4 ocorrem os polimorfismos que caracterizam os alelos desse gene. Retirando-se os íntrons, restam 1.166 pb que compõem o RNA mensageiro (mRNA). A tradução desse mRNA pode gerar diferentes isoformas de APOE dependendo do alelo que o genoma do indivíduo carregue (ABONDIO *et al*., 2019; NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2021; OJOPI; BERTONCINI; NETO, 2004).

Existem três alelos principais do gene *APOE* em humanos: ε2 presente em aproximadamente 8%, ε3 em aproximadamente 77% e ε4 em aproximadamente 15%

da população (BU, 2009). As diferenças entre esses alelos afetam diretamente a sequência de aminoácidos e a performance da proteína. Os polimorfismos Cys112Arg (rs429358) e Arg158Cys (rs7412) determinam as três principais isoformas, que são: APOE2 (112Cys/158Cys), APOE3 (112Cys/158Arg), que é a mais prevalente, e APOE4 (112Arg/158Arg). APOE também possui outras variantes considerados raros que estão sumindo da população: ε1, ε5 e ε7 (CROUCHET; BAUMERT; SCHUSTER, 2017; D'AVIGDOR *et al*., 2019; FRIEDEN, 2015; MAILLY *et al*., 1991; WRENSCH *et al*., 2018; YAMAMURA; DONG; YAMAMOTO, 1999). São escassos os trabalhos que trazem a frequência dessas raras isoformas de APOE. Um estudo com amostras de sangue de 1269 indivíduos japoneses identificou apenas 0,1% de indivíduos que possuíssem APOE ε5 e 0,7% com ε7 (MATSUNAGA *et al*., 1995). Outro trabalho publicado em 1987 com 1209 indivíduos verificou a frequência dos alelos de APOE e encontraram 78,6% com alelo APOE ε3, 13,5% com ε4, 7,5% com ε2, 0,2% com ε5 e 0,2% com alelo ε1 (ORDOVAS *et al*., 1987).

Vale ressaltar que um mesmo indivíduo pode ter circulante uma ou duas isoformas de APOE. Uma vez que humanos são seres diploides, possuem dois alelos de cada gene. Os genótipos podem variar entre homozigotos (dois alelos iguais) e heterozigotos (dois alelos diferentes). Assim, os seis genótipos principais são: ε2/ε2, ε3/ε3, ε4/ε4, ε2/ε3, ε2/ε4 e ε3/ε4.

Um fato interessante é que a numeração que distingue os polimorfismos de APOE não está relacionada com ordem de descoberta, e sim com o ponto isoelétrico. Na década de 80, estudos apontavam a heterogeneidade da APOE pelo seu ponto isoelétrico calculado por ensaios de eletroforese em gel de poliacrilamida. De acordo com a posição que a banda da isoforma ficava, elas eram enumeradas, dependendo do quão rápido ela migrasse no gel com relação a um padrão. Ficou determinado nos primeiros ensaios as bandas APOE II, III ou IV. Isso serviu para nomear as outras isoformas mais raras que foram descobertas mais tarde (WEISGRABER, 1994).

Por consequência desse parâmetro de nomenclatura, quando se estuda os polimorfismos da APOE é possível encontrar diferentes trocas de aminoácidos para explicar o que seria uma mesma isoforma. Isso acontece para APOE1. Há autores que descreveram APOE1 como portadora de 158ArgàCys/127GlyàAsp (WEISGRABER *et al*., 1984), ou apenas portadora da troca 146LysàGlu (MANN *et al*., 1989). Isso quer dizer que muitos autores tratam isoformas com diferentes polimorfismos, como se tivessem o mesmo nome, gerando confusão para os leitores. Um trabalho publicado em 1994 traz uma tabela com diferentes polimorfismos denominados da mesma forma por terem o mesmo ponto isoelétrico (WEISGRABER, 1994). Isso pode explicar o porquê de, segundo nosso conhecimento, não existir uma APOE6, mesmo existindo E5 e E7, pois apenas não existe uma isoforma que fique na posição 6 nos ensaios de ponto isoelétrico.

APOE é solúvel, monomérica e em α-hélice. Possui 299 resíduos de aminoácidos,

peso total de 35,30 kDa e dois domínios funcionais (CHEN; LI; WANG, 2011; PRONTEIN DATA BANK, 2011). O domínio N-terminal (NT) vai do resíduo 1 ao 191, já o domínio C-terminal (CT) vai do resíduo 216 ao 299. Esses dois domínios são ligados por uma estrutura de dobradiça flexível. O NT possui capacidade de se ligar aos receptores de LDL (LDLR) e se liga de forma fraca a lipídeos. Além disso, essa ligação também depende do resíduo Arg-172 presente na dobradiça que liga os domínios NT e CT (MORROW *et al.*, 2000). Já o CT possui diferentes sítios de ligação a lipoproteínas, mas não se liga ao receptor. Assim, as afinidades desses domínios se complementam para que a APOE possa exercer sua função.

Os polimorfismos de cada isoforma afetam de forma sutil a estrutura desses domínios, mas ainda assim influenciam de forma significativa na afinidade. A troca de Cisteína por Arginina na posição 112 da APOE4 (rs429358TàC) leva a uma nova ponte salina formada por Glutamato da posição 109 e Arginina da 112, o que deixa a Arginina da posição 61 mais exposta que passa a interagir com o Glutamato na 255. Essa ponte salina é exclusiva da APOE4, ou seja, as outras isoformas não possuem tal interação de domínios. Assim, estudos apontaram que essa ponte interfere de forma crítica a performance da isoforma APOE4, fazendo com que ela seja um diferencial no contexto de algumas doenças (DONG *et al.*, 1994; FERNANDEZ *et al.*, 2019; MAHLEY; WEISGRABER; HUANG, 2009; WEISGRABER, 1994).

Essa alteração estrutural foi avaliada por modelo alternativo que usou cristalografia de raios-X e espectroscopia, levando ao entendimento de que APOE4 possui eficiência menor em relação a APOE3. APOE4 passa a ter uma ligação mais forte com LDLR prejudicando a internalização pelo fígado da gordura presente na lipoproteína associada. Além disso, enquanto APOE3 tem preferência por se associar a lipoproteína de alta densidade (HDL), APOE4 tem preferência por VLDL (CROUCHET; BAUMERT; SCHUSTER, 2017; MUELLER et al., 2016).

Os polimorfismos de APOE3, por sua vez, levam a mudanças conformacionais onde os aminoácidos que formam cada domínio se alteram. O NT passa a ser contemplado do resíduo 1 ao 167, a região de dobradiça do resíduo 168 ao 205 e o CT do 206 ao 299. Esse diferencial proporciona uma conformação que leva a região principal que se liga ao LDLR a ter um desempenho melhor em sua atividade de interação (CHEN; LI; WANG, 2011).

O polimorfismo que caracteriza a APOE2 não gera uma modificação que afete de forma tão significante a conformação da proteína, mas impacta sua função de forma relevante. A troca de Arginina por Cisteína na posição 158 (rs7412CàT) compromete a eficiência do sítio de ligação a LDLR que fica no NT. A Arginina 158 de APOE 3 e APOE4 se liga ao Aspartato da posição 154, mas em APOE2 a Cisteína na 158 não consegue fazer essa ligação. Dessa forma, o Aspartato 154 se liga com a Arginina da posição 150. No entanto, Arginina 150 tem uma influência importante no sítio de ligação a LDLR e a sua ligação com Aspartato 154 prejudica a capacidade desse sítio de exercer sua função

(MAHLEY; WEISGRABER; HUANG, 2009).

Estudos em humanos, primatas não humanos e ratos mostraram que a principal fonte de APOE plasmática total é o fígado. Os hepatócitos são as células com a maior taxa na produção e secreção de APOE, no entanto células de *Kupffer* e adipócitos também são capazes de sintetizá-la (DAWSON *et al*., 1989; FRIEDMAN *et al*., 1991). O segundo maior produtor de APOE total é o cérebro, principalmente pelos astrócitos. Também são encontradas taxas de produção na glândula adrenal, testículos, pele, rins, baço, tecido adiposo e macrófagos (BIOGPS, [s.d.]; HUANG; MAHLEY, 2014). Vale ressaltar que boa parcela da secreção de APOE em outros tecidos é regulada por uma necessidade local, então não interfere na APOE plasmática (IGNATIUS *et al*., 1986; MASSIMI, 1999).

Ainda é muito limitado o conhecimento relacionado à regulação da transcrição do gene *APOE*. Mesmo que esse gene esteja em um *cluster* com genes de outras apolipoproteínas, eles são regulados de formas distintas, além de possuírem diferentes funções. A regulação da transcrição de *APOE* é altamente complexa e requer a interação de fatores de transcrição com promotores proximais, mas também com regiões regulatórias distais. Desde o século passado, por resultados de estudos *in vitro*, sabe-se que o gene *APOE* tem sua expressão controlada por regiões reguladoras presentes no promotor, que podem potencializar ou reprimir sua expressão (SMITH *et al*., 1988). No entanto, em estudos *in vivo,* foi visto que o promotor não tem a capacidade de direcionar a transcrição do gene em quaisquer células na ausência dos *enhancers* (regiões distantes do gene, mas que influenciam na sua expressão). (SHIH *et al*., 2000).

Já foram identificadas em camundongos transgênicos duas regiões de controle hepático no lócus do gene *APOE* que regulam a expressão do gene *APOE* humano: HCR-1 e HCR-2. Esta sequência HCR-2 está localizada 27 kb a jusante do gene *APOE* e a 10 kb a jusante do *enhancer* HCR-1. A análise do sequenciamento de HCR-2 revelou que tem semelhança de 85% com HCR-1 (ALLAN; WALKER; TAYLOR, 1995). Existem outras regiões já identificadas que influenciam a expressão de APOE, mas ainda faltam estudos para que se tenha uma compreensão completa dos mecanismos. Como por exemplo, os dois multi-estimuladores 1 e 2 presentes no lócus de *APOE* (ME.1 e ME.2). Estudos em macrófagos demonstraram que eles têm influência sobre o promotor do gene *APOE*, mas não foi confirmado isso em hepatócitos. Isto indica que existe uma regulação diferenciada na expressão desse gene entre diferentes células (TRUSCA *et al*., 2011).

APOE é tida como uma proteína importante para o metabolismo como um todo. O fato de ela ser sintetizada e secretada por vários tecidos e diferentes tipos de células, além de estar em abundância no líquido intersticial, na linfa e no plasma, corrobora com a certeza da importância que essa proteína tem para a homeostase do organismo (HUANG, 2010; HUANG; MAHLEY, 2014; HUANG; MUCKE, 2012). APOE é uma proteína multifuncional. Sua relação com a manutenção da homeostase metabólica e desenvolvimento de diversas doenças vem sendo estudada por vários grupos de pesquisa pelo mundo. Hoje já é

comprovada sua importância para o funcionamento do metabolismo lipídico, dos processos de neuroproteção, na resposta do organismo contra agentes infecciosos. A atuação da APOE nesses e em outros contextos pode ter diferentes respostas dependendo de qual alelo o genoma do indivíduo carregue. A eficiência da APOE em suas funções, propensão ao desenvolvimento de quadros patológicos e diferentes prognósticos obtidos, terão influência direta e divergentes entre as isoformas dessa proteína (TUDORACHE; TRUSCA; GAFENCU, 2017).

4.1.1 APOE no metabolismo lipídico

Os lipídios, tais como colesterol, triglicerídeos e fosfolipídios, são biomoléculas necessárias na produção de hormônios, composição da membrana celular, proteção contra choques mecânicos, manutenção da temperatura corporal, produção de energia, entre outros processos. Essas substâncias precisam ser carregadas de um lugar para outro por não serem solúveis no plasma. Para isso, existem as lipoproteínas que fazem esse importante e regulado papel de transferência de lipídeos. As lipoproteínas são macromoléculas formadas por lipídeos e por apolipoproteínas. O tipo de lipoproteína varia de acordo com a quantidade e tipo de lipídio que carrega, além da APO associada. A APOE faz parte da composição de VLDL, IDL, HDL, QM e Quilomícrons remanescentes (QMR), além de parte da HDL (DOSE *et al.*, 2016; PHILLIPS, 2014).

Os QM são gerados no intestino a partir da gordura e do colesterol da dieta, caracterizando a via exógena do metabolismo de lipídeos. Ao entrarem na circulação sistêmica, adquirem APOE à sua superfície. Os QM sofrem lipólise pela lipoproteína lipase (LPL) e formam QMR que vão sofrer depuração hepática após ligação mediada por APOE aos receptores de superfície celular, por exemplo, LDLR e proteoglicanos de heparansulfato (HSPG). Na via endógena, VLDLs são sintetizados e secretados pelo fígado. A LPL causa a liberação de ácidos graxos e a formação de IDL que podem ser eliminados pelo fígado, por captação mediada por APOE. A hidrólise completa de VLDL, que ocorre pela ação da LPL e a lipase hepática (LH), resulta na formação de LDL sem APOE (ou apenas com vestígios). LDL contém APOB-100 que medeia a sua absorção celular. Outro processo é o transporte reverso do colesterol que permite que o excesso de colesterol dos tecidos periféricos seja redirecionado para o fígado por meio de HDL que pode possuir APOE em sua composição (DOSE *et al.*, 2016; GETZ; REARDON, 2009).

Alguns trabalhos trazem que o polimorfismo presente na APOE pode influenciar na sua associação com lipoproteínas. APOE4 se associa preferencialmente com VLDL e APOE3 com HDL. Foi postulado que o NT, que contém o resíduo 112 em APOE, influencia a preferência da lipoproteína ao interagir com o domínio do terminal carboxila, que contém a região de ligação aos lipídeos (DONG *et al.*, 1994).

4.2 Ciclo infeccioso do HCV e sua relação com APOE

O HCV pertence à família *Flaviviridae* e gênero *Hepacivirus*, possuindo genoma de RNA fita simples e polaridade positiva de aproximadamente 9,6 Kb(ICTV, 2022). Seu genoma codifica uma poliproteína de aproximadamente 3 mil aminoácidos. Essa poliproteína passa por uma sequência de clivagens resultando em 4 proteínas estruturais (core, E1, E2 e p7) e 6 não-estruturais (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) (TELLINGHUISEN et al., 2007). As glicoproteínas E1 e E2 do envelope lipídico formam heterodímeros de superfície que permitem que o vírus se associe a LDL e VLDL do hospedeiro (ANDRÉ *et al*., 2002; NIELSEN *et al*., 2006). Essa importante estrutura formada pela associação entre o HCV e lipoproteínas é chamada de partícula lipoviral (LVP), e são críticas para o sucesso do ciclo infecioso e evolução da hepatite C (CROUCHET; BAUMERT; SCHUSTER, 2017).

Essa associação decorre da afinidade de interação entre E1 e E2 do HCV e as APO, como por exemplo: APOA1, APOB-100, APOC e APOE. No caso da interação do HCV com APOE, trabalhos mostraram que E1 é a responsável por essa afinidade, onde E2 não é capaz de sozinha interagir com APOE ou com outras APO, mas é importante para interação do HCV com receptores do hospedeiro (MAZUMDAR *et al*., 2011). A capacidade do HCV de se ligar a certas lipoproteínas permite que as LVPs tenham as mesmas propriedades biofísicas que as lipoproteínas desassociadas, aumentando o potencial infeccioso do HCV. Estudos com partículas de HCV produzidas em cultura de células confirmaram que LVPs tem baixa densidade, são ricas em colesterol e triglicerídeos, as APO continuam sendo reconhecidas por seus parceiros de interação e, por isso, o HCV se camufla no organismo como uma lipoproteína de baixa densidade comum e funcional (CROUCHET; BAUMERT; SCHUSTER, 2017; GASTAMINZA; KAPADIA; CHISARI, 2006; POPESCU *et al*., 2014; WRENSCH *et al*., 2018).

O LVP circulante, uma vez que entra no espaço de Disse (entre os capilares sinusóides e os hepatócitos), se depara com os hepatócitos (ORIÁ *et al*., 2016). No início do processo a APOE presente na LVP se liga aos HSPGs e com proteínas da família de LDLR presentes na superfície celular. Esse processo permite que o LVP se ligue a superfície da célula, nesse momento ainda de forma fraca. Em experimentos, anticorpos específicos para APOE foram capazes de bloquear de forma eficiente a ligação do HCV com células Huh-7.5 e hepatócitos humanos em cultura (JIANG *et al*., 2012; LEFÈVRE *et al*., 2014). Corroborando com a importância da APOE para essa etapa do ciclo do HCV, trabalhos de Owen e cols. e Agnello e cols. demonstraram que APOE facilita a entrada do HCV por meio da interação com LDLR (AGNELLO *et al*., 1999; OWEN *et al*., 2009). A presença ou não de APOE na lipoproteína impacta bastante a infectividade da LVP. Um exemplo disso é o cenário de atuação da LPL. Essa proteína, presente na superfície endotelial dos capilares sanguíneos, tem a função de hidrolisar triglicerídeos, aumentando a densidade e diminuindo o tamanho da lipoproteína. Esse processo leva a mudanças das APO associadas, no caso em questão

as LVPs perdem as APOE associadas. Isso faz com que a capacidade da LVP de infectar células diminua de forma drástica (SHIMIZU *et al.*, 2010).

Após a interação de APOE com HSPGs e LDLR, há interação de APOE e APOB-100 com o receptor *scavenger* de classe B tipo I (SR-BI). Esse é um receptor natural de lipoproteínas que acaba se envolvendo no processo de entrada do HCV na célula por conta da capacidade desse vírus de estar camuflado na LVP (SCARSELLI *et al.*, 2002). A interação entre LVP e SR-BI induz a dissociação entre HCV e lipoproteína, levando a exposição da glicoproteína E2 de tal forma que esta interage diretamente com SR-BI e, concomitante a isso, E2 também se liga a *cluster of differentiation* 81 (CD81) que é uma glicoproteína transmembrana da família das integrinas (ZAHID *et al.*, 2013). Mediante a isso, um complexo multirreceptor atua para promover a entrada do HCV para o interior da célula, como claudina 1, claudina 6, ocludinas, entre outras proteínas integrantes. Após essa forte fixação da partícula viral à superfície celular, a entrada do vírus ocorre por endocitose mediada por clatrina. (MANNS *et al.*, 2017; ZEISEL; FELMLEE; BAUMERT, 2013).

Um trabalho publicado em 2016 apontou diferenças para o papel da APOE na infectividade e replicação do HCV dependendo de seu genótipo. Resultados indicaram que APOE desempenha um papel importante na infectividade nos subtipos 1b e 2a do HCV e na replicação do HCV 1b, mas não na replicação do HCV 2a. Esses resultados indicam que pode existir uma diferença na eficiência na relação de APOE e HCV de acordo com o genótipo do vírus. No entanto, mais estudos são necessários para melhor elucidar essas suposições (JUNG *et al.*, 2016).

Após o processo de replicação viral, ocorre o complexo e coordenado processo de montagem das partículas virais. A montagem da partícula do HCV se inicia na superfície das membranas do RE rugoso, nas proximidades de gotículas de lipídios (precursor de lipoproteínas) (MIYANARI *et al.*, 2007). Uma vez formado, o nucleocapsídeo brota da membrana do retículo englobado pela região onde E1 e E2 estão ancoradas. Depois disso, se associam com gotículas de lipídios nascentes para adquirir APOE e APOC na sua estrutura. Muito ainda é necessário estudar para que se entenda por completo todas as etapas desse processo (WRENSCH *et al.*, 2018).

O processo de liberação da partícula viral madura ocorre por exocitose, aproveitando a via de saída de VLDL dos hepatócitos para a corrente sanguínea. Outra possibilidade é a partícula viral ser transmitida para células vizinhas e iniciar um novo ciclo infeccioso perpetuando a infecção (DUSTIN *et al.*, 2016) Já foi visto que nesse processo a maquinaria de morfogênese do VLDL é um ponto primordial. Nos hepatócitos, o precursor de VLDL, que é resultado da lipidação de APOB-100 feita pela ação da proteína de transferência de triglicerídeos microssomais (MTP), é enriquecido em lipídeos e se associa a APOE e APOC. Esse mecanismo de incorporação de APO não é bem elucidado até hoje (FUKUHARA *et al.*, 2015). No entanto, um trabalho publicado em 2009 mostrou a grande relevância de APOE nessa via, até mesmo maior que a de APOB-100 (JIANG; LUO, 2009).

Em um estudo de Jiang & Luo, publicado em 2009, realizou-se um *knockout* de APOE por RNA de interferência (siRNA) que levou a baixa produção de partículas de HCV. No entanto, a introdução de APOE expressa de forma ectópica restaurou o déficit na produção de HCV gerado pela inibição da expressão de APOE endógena. Em contraste, anticorpos específicos para APOB e até mesmo *knockout* de APOB por siRNA não tiveram efeito tão significativo na infecciosidade e produção de HCV, sugerindo que APOB não desempenha um papel tão crítico no ciclo replicativo do HCV quanto APOE (JIANG; LUO, 2009). Outros trabalhos apontaram que APOB e APOE tem o mesmo grau de significância para a montagem e liberação do HCV, mas todos concluíram que a APOE é de fato primordial (FUKUHARA *et al.*, 2014, 2015). E ainda, experimentos com células em cultura deficientes na produção de APO, como hepatócitos murinos imortalizados, células da linhagem Vero e 293T se mostraram eficientes em produzir partículas de HCV após a indução da expressão ectópica de APOE (DA COSTA *et al.*, 2012; LONG *et al.*, 2011; MURAYAMA *et al.*, 2016).

Além disso, foi visto que a depleção de APOE não afeta a formação do nucleocapsídeo do HCV, sugerindo que APOE atua em uma etapa posterior a montagem dessa estrutura. E ainda já foi visto, em ensaios de microscopia, APOB, APOE e E1E2 colocalizados no RE, sugerindo que essas proteínas atuam em uma etapa inicial da maturação da partícula do HCV, além da associação de APOE com E1E2 no LVP (BOYER *et al.*, 2014). É importante ressaltar que a APOE interage com E2 do HCV, onde essa interação não exige nenhuma outra proteína viral ou do hospedeiro para ocorrer. Isso pode sugerir que APOE desempenhe um papel importante na maturação das partículas de HCV pela interação direta com as glicoproteínas do envelope viral. Certamente isso não exclui que tenham mais parceiros de interação envolvidos no processo (LEE *et al.*, 2014).

APOA, APOC e APOE possuem a capacidade de se dissociar de uma lipoproteína e se reassociar a outra facilmente devido à presença de estruturas α-hélices anfipáticas (SUNDARAM; YAO, 2012). Estudos apontaram que a expressão de sequências curtas contendo α-hélices anfipáticas derivadas de APO e de outras proteínas, como o peptídeo humano antimicrobiano catelicidina e de NS1 de outros vírus da família *Flaviviridae*, são o suficiente para promover a produção de partículas infecciosas de HCV em células *knockout* para APOE. Dessa forma, por mais que *in vivo* a APOE pareça ser a atuante nessa etapa da montagem, ela pode ser substituída por proteínas que tenham domínios com estruturas e propriedades semelhantes (FUKUHARA *et al.*, 2014, 2017; PUIG-BASAGOITI *et al.*, 2016).

Uma outra interação importante nesse evento e que foi publicada em 2010, é entre APOE e NS5A. A relevância da interação APOE-NS5A para a infecção viral foi confirmada por estudos de coimunoprecipitação e colocalização com essas proteínas em um sistema modelo de cultura de células infectadas pelo HCV (BENGA *et al.*, 2010). Complementando esse achado, um outro trabalho do mesmo ano identificou o fragmento da APOE que é responsável por essa interação. A análise de mutagênese identificou que o domínio da α-hélice CT da APOE é importante para a ligação com NS5A. O domínio de ligação ao

receptor da porção NT e os últimos 20 aminoácidos CT de APOE são dispensáveis para a interação com NS5A, sendo relevante a porção entre os aminoácidos 205 e 280 da APOE. Deleções nessa região, além de impedir a interação, levaram a uma baixa na produção de partículas de HCV, indicando que essa associação é importante para a montagem do vírus. Além disso, foram feitos testes com as mais recorrentes isoformas de APOE (E2, E3 e E4), as quais não mostraram afetar de forma significativa essa interação. Dessa forma, essas três isoformas de APOE são igualmente compatíveis com a montagem do HCV. Isso já era de se esperar uma vez que o local dos polimorfismos que caracterizam e diferenciam essas isoformas estão localizados na porção NT (aminoácidos 112 e 158) que, como já foi dito, não interfere na interação de APOE com NS5A (CUN; JIANG; LUO, 2010).

O HCV pode se disseminar por uma transmissão direta célula a célula, além da sua associação com VLDL e liberação por exocitose (LINDENBACH; RICE, 2013). Alguns trabalhos observaram que APOE é fundamental para esse processo. Foi visto que a infecção de HCV em direção às células receptoras ocorre apenas se as células originais do HCV expressarem APOE, demonstrando que as células que geram novas partículas desse vírus e não expressam APOE não poderiam mediar a transmissão intercelular de HCV, sugerindo que APOE está envolvida no processo de transmissão do HCV entre as células (HUEGING *et al.*, 2014). Ademais, foi visto que a migração intercelular do HCV é comprometida se é silenciada a expressão de APOE nas células de onde partem os vírus, mas que esse processo não é influenciado se a expressão de APOB for silenciada (GONDAR *et al.*, 2015).

4.3 Influência da APOE na Hepatite C

4.3.1 APOE colabora camuflando o HCV do sistema imunológico

Um indivíduo infectado por HCV terá diversas quasispécies em seu organismo. Por conta da alta frequência de mutações que ocorre e se mantém no genoma viral, acaba sendo grande a diversidade genética e, consequentemente, fenotípica em um mesmo paciente. Isso permite que o vírus escape com certa facilidade do reconhecimento pelo sistema imunológico e dificulta a formulação de vacinas eficazes. Até em situações onde existam anticorpos neutralizantes circulando, as partículas virais conseguem se camuflar por estarem associados a lipoproteínas (FAUVELLE *et al.*, 2016; GAL-TANAMY *et al.*, 2008).

A participação da APOE nessa capacidade do HCV de passar praticamente despercebido pelo reconhecimento imunológico se dá de diferentes formas. Uma é o processo de transferência direta entre células das partículas virais que, como vimos, é dependente da atuação de APOE. Nesse processo o vírus não chega a cair na corrente sanguínea ou fica no meio intersticial onde poderia entrar em contato com alguma célula de

reconhecimento ou com anticorpos neutralizantes.

Além disso, diferentes publicações apontaram que a APOE da superfície dos LVPs, além de ter função de facilitar a entrada do HCV na célula, também camufla o HCV de tal forma que a associação de APOE com as proteínas presentes no envelope viral camufla os epítopos alvos. Por consequência, o HCV consegue escapar das vias de defesa da imunidade inata e adquirida, dificultando muito sua eliminação e contribuindo para a cronificação e acúmulo de complicações hepáticas. Dessa forma, um paciente que expresse uma APOE funcional terá maior dificuldade de chegar ao *clearance* viral (BANKWITZ *et al*., 2017; FAUVELLE *et al*., 2016).

4.3.2 Influência dos diferentes alelos de APOE na evolução da hepatite C

O gene *APOE* pode se apresentar com diferentes alelos que codificam proteínas distintas entre si. Essa pequena modificação estrutural da APOE impacta na eficiência dessa proteína. Entre os três alelos de *APOE* mais recorrentes na população (ε2, ε3 ε4), o alelo ε4 é o que codifica a proteína com a diferença conformacional e funcional mais discrepante das outras. As características estruturais e particularidades metabólicas de cada isoforma impactam de forma significativa sua função, o que faz com que os indivíduos que carreguem o alelo ε4 do gene *APOE* terem uma maior probabilidade de desenvolver determinadas doenças, impactando de forma ruim na longevidade. No entanto, no contexto da hepatite C, carregar esse alelo é uma vantagem, pois a presença da APOE4 ajuda a proteger o paciente infectado com HCV de desenvolver um quadro mais agressivo da doença. Enquanto o alelo ε2 está associado com o rápido *clearance* viral e um baixo risco de cronificação, o ε3, que é o alelo selvagem, no contexto da hepatite C é o de pior prognóstico (HISHIKI *et al*., 2010). É interessante perceber que os mesmos motivos que fazem do alelo ε4 do *APOE* um indicador de mau prognóstico que aumenta a chance de o indivíduo desenvolver e ter dificuldades no tratamento de diversas doenças, também o faz ser um bom prognóstico para os pacientes com hepatite C. O fato de o HCV ser dependente da APOE em diversos momentos do seu ciclo infeccioso, faz com que uma isoforma de APOE que não exerça suas funções de forma eficiente ou que tenha alguma diferença conformacional que influencie nas interações com seus parceiros, seja um fator que comprometa a evolução e sucesso na infecção.

Um trabalho publicado em 2002 demonstrou que entre os 65 pacientes com hepatite C crônica com menor comprometimento hepático, 20% possuíam o alelo ε4 do *APOE*, e entre os 46 pacientes com hepatite C mais agressiva apenas 6,5% carregavam esse alelo. Esses dados indicaram que o alelo ε3 pode ter um efeito protetor contra lesões hepáticas (WOZNIAK *et al*., 2002).

Já em 2003, Muller e cols. mostraram em um estudo com pacientes com hepatite C crônica que a frequência de APOE ε4 era significativamente baixa nesse grupo. Em

outro trabalho, Muller e cols. sugeriram que enquanto APOE ε4 tem um papel protetor nesse contexto, APOE ε3 leva a um maior risco de cronificação e evolução para formas mais graves da doença. Ele mostrou em seu estudo com pacientes com hepatite C crônica uma alta frequência de ε4 em pacientes não cirróticos, o que sustenta a hipótese de ação protetora contra a infecção pelo HCV (MUELLER *et al.*, 2003, 2016). Junto a isso, outros trabalhos associam a APOE ε3 com rápida progressão de fibrose em pacientes HCV-positivos crônicos. Como o trabalho de Fabris e cols. que afirmou que a base genética da APOE está altamente relacionada com variabilidade da progressão da hepatite C para cada paciente (FABRIS *et al.*, 2011).

Corroborando com esses dados, um estudo publicado em 2019 feito com 299 pacientes HCV-positivos que nunca passaram por tratamento, mostrou que a frequência de APOE ε4 é maior nos pacientes que chegaram ao *clearance* viral espontâneo (12,4%) do que nos pacientes que evoluíram para a hepatite C crônica (7,3%) (GONZALEZ-ALDACO *et al.*, 2019).

Quando se compara o grau de fibrose e danos hepáticos em pacientes com hepatite C crônica homozigotos para APOE ε3 com os que carregam APOE ε4, a taxa de dano se mostrou ser maior que o dobro em pacientes APOE ε3 do que em ε4. Ou seja, a forma selvagem da proteína é uma vantagem para que o vírus tenha sucesso em seu ciclo (CHIBA-FALEK *et al.*, 2012).

No levantamento bibliográfico realizado para o embasamento dessa revisão, encontramos um trabalho que relaciona pacientes brasileiros com hepatite C e APOE. Neste trabalho 179 pacientes tiveram o genótipo da APOE analisado e foi encontrada maior prevalência da APOE3 (67,3%). Além disso, a APOE4 protegeu contra progressão da doença hepática e do grau de inflamação de pacientes HCV-positivos (NASCIMENTO *et al.*, 2021).

Assim, mais estudos são necessários. Considerando a diversidade genotípica dos brasileiros, estudos amplos nesse nicho agregariam muito valor e confiabilidade na relação APOE-hepatite C. Um fato que reforça essa necessidade de mais estudos com brasileiros é que dados da tese de Nascimento sugerem que ser portador de APOE2 aumenta o risco de pacientes na fase crônica da hepatite C de desenvolver cirrose hepática. Além disso, a prevalência encontrada dos alelos de APOE no seu estudo com 179 pacientes com hepatite C crônica, difere muito dos dados mundiais. Foi quantificado para os alelos ε3 e ε4 uma prevalência de 67,3% e 15,6%, respectivamente. E, de forma inesperada, E2 foi a segunda mais prevalente, com 17,1%. São necessários mais estudos em pacientes brasileiros para esclarecer essa relação de APOE2 e aumentar o número de indivíduos visando gerar uma prevalência mais representativa (NASCIMENTO, 2020).

A relação entre APOE e HCV tem importância em todo o ciclo infeccioso e na evolução da doença e, além disso, tem implicações no desenvolvimento de novos métodos de tratamento e no desenvolvimento de vacinas contra a hepatite C. Entender melhor como

ocorre, onde ocorre e a relevância que tem a interação entre HCV e APOE para o sucesso da infecção, permite descobrir novos alvos para direcionar a ação de antivirais e vacinas. Por mais que existam os antivirais de ação direta (DAAs), que são hoje o tratamento mais avançado e com melhores resultados, é necessário o desenvolvimento de ferramentas terapêuticas que permitam uma resposta virológica sustentada (RVS) em maior número de pacientes, visto que alguns ainda não atingem este objetivo mesmo com diferentes combinações de antivirais. Ter apenas as proteínas do vírus como alvo é preocupante, uma vez que a frequência de mutação é alta e gera grande variabilidade, afetando diretamente no sucesso do tratamento. Assim, novos alvos além do vírus são uma boa escolha no desenvolvimento de novos tratamentos.

Com base nos estudos que mostraram que a APOE tem a capacidade de camuflar o HCV no sistema imunológico e ainda é importante na entrada do vírus na célula, além da atuação de APOB, desenvolveram o Avasimibe. Esse fármaco é um inibidor do transporte de lipídios, clinicamente aprovado, que leva a uma diminuição da liberação de APOB e APOE. O Avasimibe se mostrou eficaz em infecções por diversos genótipos do HCV (HU *et al*., 2017). Ainda é necessário investir em estudos que pesquisem sobre a relação de APOE com HCV e quais os parceiros de interação participam do processo infeccioso. Com esse conhecimento bem fundamentado será mais fácil eleger os alvos mais eficazes para tentar o desenvolvimento de fármacos e vacinas contra hepatite C.

5 | CONCLUSÃO

Com essa revisão conseguimos entender como as diferenças entre os alelos do gene *APOE* influenciam na estrutura e função das isoformas da proteína e correlacionar isso ao seu efeito na hepatite C. Compilamos diferentes trabalhos que corroboraram com a importância dessa proteína no sucesso da infecção pelo HCV e com a necessidade de mais estudos - biomoleculares, genéticos e populacionais – da relação de APOE e suas isoformas com a evolução da doença. Inclusive, estudos de grupos de brasileiros se fazem necessários para um melhor esclarecimento da importância de APOE dentro do perfil dos pacientes do Brasil e como um possível alvo no desenvolvimento de fármacos e vacinas para combater a hepatite C.

REFERÊNCIAS

ABONDIO, P. et al. The genetic variability of APOE in different human populations and its implications for longevity. **Genes**, v. 10, n. 3, p. 1–31, 2019.

AGNELLO, V. et al. Hepatitis C virus and other Flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 22, p. 12766–12771, 26 out. 1999.

ALLAN, C. M.; WALKER, D.; TAYLOR, J. M. Evolutionary Duplication of a Hepatic Control Region in the Human Apolipoprotein E Gene Locus. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 44, p. 26278–26281, nov. 1995.

ANDRÉ, P. et al. Characterization of Low- and Very-Low-Density Hepatitis C Virus RNA-Containing Particles. **Journal of Virology**, v. 76, n. 14, p. 6919–6928, 15 jul. 2002.

BABIN, P. J. et al. Both apolipoprotein E and A-I genes are present in a nonmammalian vertebrate and are highly expressed during embryonic development. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 16, p. 8622–8627, 5 ago. 1997.

BANKWITZ, D. et al. Maturation of secreted HCV particles by incorporation of secreted ApoE protects from antibodies by enhancing infectivity. **Journal of Hepatology**, v. 67, n. 3, p. 480–489, set. 2017.

BAUM, L. et al. Apolipoprotein E isoforms in Alzheimer's disease pathology and etiology. **Microscopy Research and Technique**, v. 50, n. 4, p. 278–281, 15 ago. 2000.

BENGA, W. J. A. et al. Apolipoprotein E interacts with hepatitis C virus nonstructural protein 5A and determines assembly of infectious particles. **Hepatology**, v. 51, n. 1, p. 43–53, jan. 2010.

BIOGPS. **APOE (apolipoprotein E)**. Disponível em: <http://biogps.org/#goto=genereport&id=348>. Acesso em: 15 mar. 2021.

BORGIA, S. M. et al. Identification of a Novel Hepatitis C Virus Genotype From Punjab, India: Expanding Classification of Hepatitis C Virus Into 8 Genotypes. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 218, n. 11, p. 1722–1729, 20 out. 2018.

BOYER, A. et al. The Association of Hepatitis C Virus Glycoproteins with Apolipoproteins E and B Early in Assembly Is Conserved in Lipoviral Particles. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 27, p. 18904–18913, jul. 2014.

BU, G. Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 5, p. 333–344, 2 maio 2009.

CAMPIOTTO, S. et al. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 1, p. 41–49, jan. 2005.

CHEN, J.; LI, Q.; WANG, J. Topology of human apolipoprotein E3 uniquely regulates its diverse biological functions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 36, p. 14813–14818, 6 set. 2011.

CHIBA-FALEK, O. et al. Pleiotropy and allelic heterogeneity in the TOMM40-APOE genomic region related to clinical and metabolic features of hepatitis C infection. **Human Genetics**, v. 131, n. 12, p. 1911–1920, 17 dez. 2012.

CHOO, Q. et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**, v. 244, n. 4902, p. 359–362, 21 abr. 1989.

CROUCHET, E.; BAUMERT, T. F.; SCHUSTER, C. Hepatitis C virus–apolipoprotein interactions: molecular mechanisms and clinical impact. **Expert Review of Proteomics**, v. 14, n. 7, p. 593–606, 2017.

CUN, W.; JIANG, J.; LUO, G. The C-Terminal α-Helix Domain of Apolipoprotein E Is Required for Interaction with Nonstructural Protein 5A and Assembly of Hepatitis C Virus. **Journal of Virology**, v. 84, n. 21, p. 11532–11541, 1 nov. 2010.

CUNHA, A. R. C. DA et al. **Boletim Epidemiológico Hepatites Virais | 2022**. [s.l: s.n.].

D'AVIGDOR, W. M. H. et al. Virus Genotype-Dependent Transcriptional Alterations in Lipid Metabolism and Inflammation Pathways in the Hepatitis C Virus-infected Liver. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 10596, 22 dez. 2019.

DA COSTA, D. et al. Reconstitution of the Entire Hepatitis C Virus Life Cycle in Nonhepatic Cells. **Journal of Virology**, v. 86, n. 21, p. 11919–11925, 1 nov. 2012.

DAWSON, P. A. et al. Quantification and regulation of apolipoprotein E expression in rat Kupffer cells. **Journal of lipid research**, v. 30, n. 3, p. 403–13, mar. 1989.

DONG, L. M. et al. Human apolipoprotein E. Role of arginine 61 in mediating the lipoprotein preferences of the E3 and E4 isoforms. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 35, p. 22358–22365, set. 1994.

DOSE, J. et al. APOE genotype and stress response - a mini review. **Lipids in Health and Disease**, v. 15, n. 1, p. 121, 25 dez. 2016.

DUSTIN, L. B. et al. Hepatitis C virus: life cycle in cells, infection and host response, and analysis of molecular markers influencing the outcome of infection and response to therapy. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 10, p. 826–832, out. 2016.

FABRIS, C. et al. Apolipoprotein E genotypes modulate fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C and persistently normal transaminases. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 26, n. 2, p. 328–333, fev. 2011.

FAUVELLE, C. et al. Apolipoprotein E Mediates Evasion From Hepatitis C Virus Neutralizing Antibodies. **Gastroenterology**, v. 150, n. 1, p. 206- 217.e4, jan. 2016.

FERNANDEZ, C. G. et al. The Role of APOE4 in Disrupting the Homeostatic Functions of Astrocytes and Microglia in Aging and Alzheimer's Disease. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 11, 11 fev. 2019.

FRIEDEN, C. ApoE: The role of conserved residues in defining function. **Protein Science**, v. 24, n. 1, p. 138–144, 2015.

FRIEDMAN, G. et al. Apolipoprotein E is secreted by cultured lipocytes of the rat liver. **Journal of lipid research**, v. 32, n. 1, p. 107–14, jan. 1991.

FUKUHARA, T. et al. Roles of Lipoproteins and Apolipoproteins in Particle Formation of Hepatitis C Virus. **Trends in Microbiology**, v. 23, n. 10, p. 618–629, out. 2015.

GAL-TANAMY, M. et al. In vitro selection of a neutralization-resistant hepatitis C virus escape mutant. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 49, p. 19450–19455, 9 dez. 2008.

GASTAMINZA, P.; KAPADIA, S. B.; CHISARI, F. V. Differential Biophysical Properties of Infectious Intracellular and Secreted Hepatitis C Virus Particles. **Journal of Virology**, v. 80, n. 22, p. 11074–11081, 1 nov. 2006.

GETZ, G. S.; REARDON, C. A. Apoprotein E as a lipid transport and signaling protein in the blood, liver, and artery wall. **Journal of Lipid Research**, v. 50, p. S156–S161, 2009.

GONDAR, V. et al. Apolipoprotein E, but Not Apolipoprotein B, Is Essential for Efficient Cell-to-Cell Transmission of Hepatitis C Virus. **Journal of Virology**, v. 89, n. 19, p. 9962–9973, 1 out. 2015.

GONG, Y.; CUN, W. The Role of ApoE in HCV Infection and Comorbidity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 8, p. 2037, 25 abr. 2019.

GONZALEZ-ALDACO, K. et al. Hepatitis C virus clearance and less liver damage in patients with high cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol and APOE ε 4 allele. **World Journal of Gastroenterology**, v. 25, n. 38, p. 5826–5837, 14 out. 2019.

GOTTLIEB, M. G. V. et al. Envelhecimento e longevidade no Rio Grande do Sul: um perfil histórico, étnico e de morbi-mortalidade dos idosos. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 14, n. 2, p. 365–380, jun. 2011.

HAVEL, R. J.; KANE, J. P. Primary Dysbetalipoproteinemia: Predominance of a Specific Apoprotein Species in Triglyceride-Rich Lipoproteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 70, n. 7, p. 2015–2019, 1 jul. 1973.

HISHIKI, T. et al. Infectivity of Hepatitis C Virus Is Influenced by Association with Apolipoprotein E Isoforms. **Journal of Virology**, v. 84, n. 22, p. 12048–12057, 15 nov. 2010.

HU, L. et al. Avasimibe: A novel hepatitis C virus inhibitor that targets the assembly of infectious viral particles. **Antiviral Research**, v. 148, p. 5–14, dez. 2017.

HUANG, Y. Aβ-independent roles of apolipoprotein E4 in the pathogenesis of Alzheimer’s disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 16, n. 6, p. 287–294, jun. 2010.

HUANG, Y.; MAHLEY, R. W. Apolipoprotein E: Structure and function in lipid metabolism, neurobiology, and Alzheimer’s diseases. **Neurobiology of Disease**, v. 72, p. 3–12, dez. 2014.

HUANG, Y.; MUCKE, L. Alzheimer Mechanisms and Therapeutic Strategies. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1204–1222, mar. 2012.

HUEBBE, P.; RIMBACH, G. Evolution of human apolipoprotein E (APOE) isoforms: Gene structure, protein function and interaction with dietary factors. **Ageing Research Reviews**, v. 37, p. 146–161, 2017.

HUEGING, K. et al. Apolipoprotein E Codetermines Tissue Tropism of Hepatitis C Virus and Is Crucial for Viral Cell-to-Cell Transmission by Contributing to a Postenvelopment Step of Assembly. **Journal of Virology**, v. 88, n. 3, p. 1433–1446, 1 fev. 2014.

ICTV. **Family: Flaviviridae**. Disponível em: <https://ictv.global/report/chapter/flaviviridae/flaviviridae>. Acesso em: 20 dez. 2022.

IGNATIUS, M. J. et al. Expression of apolipoprotein E during nerve degeneration and regeneration. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 4, p. 1125–1129, 1 fev. 1986.

JIANG, J. et al. Hepatitis C Virus Attachment Mediated by Apolipoprotein E Binding to Cell Surface Heparan Sulfate. **Journal of Virology**, v. 86, n. 13, p. 7256–7267, 1 jul. 2012.

JIANG, J.; LUO, G. Apolipoprotein E but Not B Is Required for the Formation of Infectious Hepatitis C Virus Particles. **Journal of Virology**, v. 83, n. 24, p. 12680–12691, 2009.

JUNG, B.-K. et al. Roles of human apolipoprotein E in the infectivity and replication of hepatitis C virus genotype 2a. **Journal of Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 451–458, 27 jun. 2016.

KAMEDA, K.; CORRÊA, M. C. D. V.; CASSIER, M. A incorporação do teste diagnóstico baseado na amplificação de ácidos nucleicos (NAT) para triagem de sangue no SUS: arranjos tecnológicos para a nacionalização do “NAT brasileiro”. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v. 28, n. 1, 24 maio 2018.

KEN-DROR, G. et al. APOE/C1/C4/C2 Gene Cluster Genotypes, Haplotypes and Lipid Levels in Prospective Coronary Heart Disease Risk Among UK Healthy Men. **Molecular Medicine**, v. 16, n. 9–10, p. 389–399, 20 set. 2010.

LEE, J.-Y. et al. Apolipoprotein E Likely Contributes to a Maturation Step of Infectious Hepatitis C Virus Particles and Interacts with Viral Envelope Glycoproteins. **Journal of Virology**, v. 88, n. 21, p. 12422–12437, 1 nov. 2014.

LEFÈVRE, M. et al. Syndecan 4 Is Involved in Mediating HCV Entry through Interaction with Lipoviral Particle-Associated Apolipoprotein E. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e95550, 21 abr. 2014.

LEREN, T. P. et al. Increased frequency of the apolipoprotein E-4 isoform in male subjects with multifactorial hypercholesterolemia. **Clinical genetics**, v. 27, n. 5, p. 458–62, maio 1985.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 688–700, 10 out. 2013.

LONG, G. et al. Mouse Hepatic Cells Support Assembly of Infectious Hepatitis C Virus Particles. **Gastroenterology**, v. 141, n. 3, p. 1057–1066, set. 2011.

LUNETTA, A. C. F & LUÍS, M. A. V. Álcool, Drogas e Comportamentos de Risco Entre Pacientes Ambulatoriais com hepatite C em Hospital Universitário. **Rev. enferm. UERJ.**, v. 16, n. 4, p. 538–544, 2008.

MAHLEY, R. W.; WEISGRABER, K. H.; HUANG, Y. Apolipoprotein E: structure determines function, from atherosclerosis to Alzheimer’s disease to AIDS. **Journal of Lipid Research**, v. 50, p. S183–S188, 2009.

MAILLY, F. et al. Characterization of a new apolipoprotein E5 variant detected in two French-Canadian subjects. **Journal of lipid research**, v. 32, n. 4, p. 613–20, abr. 1991.

MANN, W. A. et al. Apolipoprotein E-1Harrisburg: a new variant of apolipoprotein E dominantly associated with type III hyperlipoproteinemia. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism**, v. 1005, n. 3, p. 239–244, out. 1989.

MANNS, M. P. et al. Hepatitis C virus infection. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 1, p. 17006, 21 dez. 2017.

MASSIMI, M. Differential expression of apolipoprotein E messenger RNA within the rat liver lobule determined by in situ hybridization. **Hepatology**, v. 29, n. 5, p. 1549–1555, 1999.

MATSUNAGA, A. et al. Population frequency of apolipoprotein E5 (Glu3-->Lys) and E7 (Glu244-->Lys, Glu245-->Lys) variants in western Japan. **Clinical genetics**, v. 48, n. 2, p. 93–9, ago. 1995.

MAZUMDAR, B. et al. Hepatitis C virus E1 envelope glycoprotein interacts with apolipoproteins in facilitating entry into hepatocytes. **Hepatology**, v. 54, n. 4, p. 1149–1156, out. 2011.

MCINTOSH, A. M. et al. The Apolipoprotein E (APOE) Gene Appears Functionally Monomorphic in Chimpanzees (Pan troglodytes). **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. e47760, 24 out. 2012.

MEGALE, R. Z. et al. Apolipoprotein E polymorphism and functional disability in Brazilian elders: the Bambuí Health and Aging Study. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 32, n. 2, 2016.

MILLMAN, A. J.; NELSON, N. P.; VELLOZZI, C. Hepatitis C: Review of the Epidemiology, Clinical Care, and Continued Challenges in the Direct-Acting Antiviral Era. **Current Epidemiology Reports**, v. 4, n. 2, p. 174–185, 20 jun. 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de aconselhamento em hepatites virais**. [s.l: s.n.]. v. 1

MIYANARI, Y. et al. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. **Nature Cell Biology**, v. 9, n. 9, p. 1089–1097, 26 set. 2007.

MORROW, J. A. et al. Effect of Arginine 172 on the Binding of Apolipoprotein E to the Low Density Lipoprotein Receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 4, p. 2576–2580, jan. 2000.

MUELLER, T. et al. Apolipoprotein E4 allele is associated with poor treatment response in hepatitis C virus (HCV) genotype 1. **Hepatology**, v. 38, n. 6, p. ajhep09042, dez. 2003.

MUELLER, T. et al. Apolipoprotein E allele frequencies in chronic and self-limited hepatitis C suggest a protective effect of APOE4 in the course of hepatitis C virus infection. **Liver International**, v. 36, n. 9, p. 1267–1274, set. 2016.

MURAYAMA, A. et al. Completion of the Entire Hepatitis C Virus Life Cycle in Vero Cells Derived from Monkey Kidney. **mBio**, v. 7, n. 3, 6 jul. 2016.

NASCIMENTO, J. C. R. et al. Impact of apolipoprotein E genetic polymorphisms on liver disease: An essential review. **Annals of Hepatology**, v. 19, n. 1, p. 24–30, 2020.

NASCIMENTO, J. C. R. **POLIMORFISMO DA APOLIPOPROTEÍNA E NA CIRROSE HEPÁTICA INDUZIDA PELO VÍRUS DA HEPATITE C COM OU SEM CARCINOMA HEPATOCELULAR NO PERIOPERATÓRIO DE TRANSPLANTE ORTOTÓPICO DE FÍGADO**. [s.l: s.n.].

NASCIMENTO, J. C. R. et al. Apolipoprotein E polymorphism influences orthotopic liver transplantation outcomes in patients with hepatitis C virus-induced liver cirrhosis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 27, n. 11, p. 1064–1075, 21 mar. 2021.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, U. S. N. L. OF M. APOE apoliprotrein E [Homo sapiens (human)]. 2021.

NIELSEN, S. U. et al. Association between Hepatitis C Virus and Very-Low-Density Lipoprotein (VLDL)/LDL Analyzed in Iodixanol Density Gradients. **Journal of Virology**, v. 80, n. 5, p. 2418–2428, 1 mar. 2006.

OJOPI, E. P. B.; BERTONCINI, A. B.; NETO, E. D. Apolipoproteína E e a doença de Alzheimer Artigo Original. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 31, n. 1, p. 26–33, 2004.

OLAISEN, B.; TEISBERG, P.; GEDDE-DAHL, T. The locus for apolipoprotein E (apoE) is linked to the complement component C3 (C3) locus on chromosome 19 in man. **Human Genetics**, v. 62, n. 3, p. 233–236, dez. 1982.

ORDOVAS, J. M. et al. Apolipoprotein E isoform phenotyping methodology and population frequency with identification of apoE1 and apoE5 isoforms. **Journal of lipid research**, v. 28, n. 4, p. 371–80, abr. 1987.

ORIÁ, R. B. et al. Fisiologia Hepática. **Sistema Digestório: Integração Básico-Clínica**, p. 575–602, 2016.

ORTH, M.; BELLOSTA, S. Cholesterol: Its Regulation and Role in Central Nervous System Disorders. **Cholesterol**, v. 2012, p. 1–19, 17 out. 2012.

OWEN, D. M. et al. Apolipoprotein E on hepatitis C virion facilitates infection through interaction with low-density lipoprotein receptor. **Virology**, v. 394, n. 1, p. 99–108, nov. 2009.

PHILLIPS, M. C. Apolipoprotein E isoforms and lipoprotein metabolism. **IUBMB Life**, v. 66, n. 9, p. 616–623, set. 2014.

POPESCU, C.-I. et al. Hepatitis C Virus Life Cycle and Lipid Metabolism. **Biology**, v. 3, n. 4, p. 892–921, 15 dez. 2014.

PRONTEIN DATA BANK. **Structure of full length apoE3**. Disponível em: <https://www.rcsb.org/structure/2L7B>.

PUMEECHOCKCHAI, W. et al. Hepatitis C virus particles of different density in the blood of chronically infected immunocompetent and immunodeficient patients: Implications for virus clearance by antibody. **Journal of Medical Virology**, v. 68, n. 3, p. 335–342, nov. 2002.

RALL, S. C.; WEISGRABER, K. H.; MAHLEY, R. W. Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence. **The Journal of biological chemistry**, v. 257, n. 8, p. 4171–8, 25 abr. 1982.

RIBEIRO, M. DE F. G. DE S. **Fatores prognósticos na evolução da hepatite C**. [s.l: s.n.].

ROSEN, H. R.; GRETCH, D. R. Hepatitis C virus: current understanding and prospects for future therapies. **Molecular Medicine Today**, v. 5, n. 9, p. 393–399, set. 1999.

SCARSELLI, E. et al. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. **The EMBO Journal**, v. 21, n. 19, p. 5017–5025, 1 out. 2002.

SHIH, S.-J. et al. Duplicated Downstream Enhancers Control Expression of the Human Apolipoprotein E Gene in Macrophages and Adipose Tissue. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 41, p. 31567–31572, out. 2000.

SHIMIZU, Y. et al. Lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase reduce the infectivity of hepatitis C virus (HCV) through their catalytic activities on HCV-associated lipoproteins. **Virology**, v. 407, n. 1, p. 152–159, nov. 2010.

SHORE, B. et al. An apolipoprotein preferentially enriched in cholesteryl ester-rich very low density lipoproteins. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 58, n. 1, p. 1–7, maio 1974.

SHORE, V. G.; SHORE, B. Heterogeneity of human plasma very low density lipoproteins. Separation of species differing in protein components. **Biochemistry**, v. 12, n. 3, p. 502–507, 1 jan. 1973.

SMITH, D. B. et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: Updated criteria and genotype assignment web resource. **Hepatology**, v. 59, n. 1, p. 318–327, 20 jan. 2014.

SMITH, J. D. et al. Expression of the human apolipoprotein E gene is regulated by multiple positive and negative elements. **The Journal of biological chemistry**, v. 263, n. 17, p. 8300–8, 15 jun. 1988.

TAKAHASHI, C. et al. Ocorrência de hepatites não-anão-B em unidade de hemodiálise. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 21, n. 3, p. 105–111, set. 1988.

TELLINGHUISEN, T. L. et al. Studying Hepatitis C Virus: Making the Best of a Bad Virus. **Journal of Virology**, v. 81, n. 17, p. 8853–8867, 1 set. 2007.

TERRAULT, N. A. Sexual activity as a risk factor for hepatitis C. **Hepatology**, v. 36, n. 5B, p. s99–s105, nov. 2002.

THE EUROPEAN BIOINFORMATICS INSTITUTE. **Família: Apolipoproteína (PF01442)**. Disponível em: <https://pfam.xfam.org/family/Apolipoprotein>. Acesso em: 1 mar. 2021.

TRUSCA, V. G. et al. Macrophage-specific Up-regulation of Apolipoprotein E Gene Expression by STAT1 Is Achieved via Long Range Genomic Interactions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 16, p. 13891–13904, abr. 2011.

TUDORACHE, I. F.; TRUSCA, V. G.; GAFENCU, A. V. Apolipoprotein E - A Multifunctional Protein with Implications in Various Pathologies as a Result of Its Structural Features. **Computational and structural biotechnology journal**, v. 15, p. 359–365, 2017.

UTERMANN, G.; JAESCHKE, M.; MENZEL, J. Familial hyperlipoproteinemia type III: Deficiency of a specific apolipoprotein (APO E-III) in the very-low-density lipoproteins. **FEBS Letters**, v. 56, n. 2, p. 352–355, 1 ago. 1975.

VALENTE, C.; FERNANDES, C.; TRINDADE, L. Hepatite C aguda no profissional de saúde - revisão a propósito de um caso clínico. **Jornal Português de Gastrenterologia** , v. 17, n. 6, p. 255–261, 2010.

WEISGRABER, K. H. et al. A novel electrophoretic variant of human apolipoprotein E. Identification and characterization of apolipoprotein E1. **Journal of Clinical Investigation**, v. 73, n. 4, p. 1024–1033, 1 abr. 1984.

WEISGRABER, K. H. Apolipoprotein E: Structure-function relationships. **Advances in Protein Chemistry**, v. 45, p. 249–302, 1994.

WILSON, C. et al. Three-dimensional structure of the LDL receptor-binding domain of human apolipoprotein E. **Science**, v. 252, n. 5014, p. 1817–1822, 28 jun. 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Hepatite C**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>. Acesso em: 16 fev. 2020.

WOZNIAK, M. A. et al. Apolipoprotein E-ε4 protects against severe liver disease caused by hepatitis C virus. **Hepatology**, v. 36, n. 2, p. 456–463, ago. 2002.

WRENSCH, F. et al. Hepatitis C Virus (HCV)–Apolipoprotein Interactions and Immune Evasion and Their Impact on HCV Vaccine Design. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 21 jun. 2018.

YAMAMURA, T.; DONG, L. M.; YAMAMOTO, A. Characterization of apolipoprotein E7 (Glu(244)-->Lys, Glu(245)--->Lys), a mutant apolipoprotein E associated with hyperlipidemia and atherosclerosis. **Journal of lipid research**, v. 40, n. 2, p. 253–9, fev. 1999.

ZAHID, M. N. et al. The postbinding activity of scavenger receptor class B type I mediates initiation of hepatitis C virus infection and viral dissemination. **Hepatology**, v. 57, n. 2, p. 492–504, fev. 2013.

ZANNIS, V. I. et al. Proposed nomenclature of apoE isoproteins, apoE genotypes, and phenotypes. **Journal of lipid research**, v. 23, n. 6, p. 911–4, ago. 1982.

ZANNIS, V. I.; BRESLOW, J. L. Human very low density lipoprotein apolipoprotein E isoprotein polymorphism is explained by genetic variation and posttranslational modification. **Biochemistry**, v. 20, n. 4, p. 1033–1041, 17 fev. 1981.

ZEISEL, M. B.; FELMLEE, D. J.; BAUMERT, T. F. Hepatitis C Virus Entry. In: [s.l: s.n.]. p. 87–112.

CAPÍTULO 2

TRANSPLANTE MITOCONDRIAL: ASPECTOS TECNOLÓGICOS E APLICAÇÕES CLÍNICAS DA MITOTERAPIA

Data de submissão: 07/04/2023 *Data de aceite: 02/05/2023*

Pedro Augusto Chikoski Albrecht
Laboratório de Bioquímica Celular, Departamento de Bioquímica/ICBS Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
Porto Alegre – Rio Grande do Sul
https://lattes.cnpq.br/1088583647100647

Antônio Galina
Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)
Rio de Janeiro – Rio de Janeiro
http://lattes.cnpq.br/8940530306495736

Fábio Klamt
Laboratório de Bioquímica Celular, Departamento de Bioquímica/ICBS Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
Porto Alegre – Rio Grande do Sul
http://lattes.cnpq.br/3256932358053453

RESUMO: A mitoterapia (transplante de mitocôndrias) é uma técnica recente que busca, através da administração de mitocôndrias funcionais isoladas, reverter disfunções celulares em uma variedade de condições patológicas em tecidos - como isquemias pulmonar, cardíaca e cerebral, doença de Parkinson, esquizofrenia e declínio cognitivo. Sua abordagem terapêutica diferencia-se da tradicional aplicação observada no uso de fármacos ou moléculas redox-sensíveis direcionadas para a população de mitocôndrias do órgão afetado. Em modelos celulares, animais e humanos, a mitoterapia já demonstrou potencial de recuperação do perfil metabólico, reversão do estresse celular e de danos teciduais. No entanto, diversos são os parâmetros ainda não padronizados que limitam o aprimoramento da técnica quanto à sua optimização e reprodutibilidade, e dificultam a sua ampla aplicação clínica. Neste capítulo exploramos os aspectos tecnológicos do transplante de mitocôndrias. Discutimos os resultados já obtidos e os desafios da implementação de uma técnica de caráter incipiente que apresenta grande diversidade de modelos celulares utilizados e variabilidade nos métodos empregados. A mitoterapia carece de técnicas padronizadas que garantam com satisfatória reprodutibilidade e robustez a demonstração de seus potenciais benefícios terapêuticos. Ainda assim, o transplante de mitocôndrias permanece sendo uma possibilidade promissora para o tratamento de diversas condições patológicas.

PALAVRAS-CHAVE: transplante mitocondrial; mitoterapia; disfunção mitocondrial; opção terapêutica.

MITOCHONDRIAL TRANSPLANTATION: TECHNOLOGICAL ASPECTS AND CLINICAL APPLICATION OF MITOTHERAPY

ABSTRACT: Mitotherapy (mitochondrial transplant) is a recent technique that seeks, through the administration of isolated functional mitochondria, to reverse cellular dysfunctions in a variety of pathological conditions - such as pulmonary, cardiac and cerebral ischemia, Parkinson's disease, schizophrenia and cognitive decline. Its therapeutic approach differs from the traditional application observed in the use of drugs or redox-sensitive molecules directed to the mitochondrial population of the affected organ. In cellular, animal and human models, this strategy has already demonstrated potential for recovery of the metabolic profile, reversal of cellular stress and tissue damage. However, there are several parameters that have not yet been standardized, which limit the improvement of the technique in terms of its optimization and reproducibility, and hinder its wide clinical application. In this chapter we explore the technological aspects of mitochondria transplantation. We discuss the results already obtained and the challenges of implementing an incipient technique that presents a great diversity of cell models and variability in the methods. Mitotherapy lacks standardized techniques that guarantee satisfactory reproducibility and robustness in demonstrating its potential therapeutic benefits. Still, mitochondria transplantation remains a potential possibility for the treatment of several pathological conditions.
KEYWORDS: Mitochondrial transplant; mitotherapy; mitochondrial dysfunction; therapeutic option.

1 I INTRODUÇÃO

Mitocôndrias são organelas de origem proteobacteriana essenciais para a vida (SCHWARTZ; DAYHOFF, 1978). Dentre suas funções mais proeminentes estão a obtenção de energia química pela oxidação de intermediários metabólicos (KAPPLER *et al*., 2019), a síntese de fosfolipídeos e grupamento heme (DAUM, 1985), tamponamento de cálcio (JOUAVILLE *et al*, 1999), parte do ciclo da uréia, e a indução da morte celular programada, ou apoptose (LI; DEWSON, 2015). Considerando seu papel nas demandas metabólicas e de sinalização na célula, as disfunções mitocondriais - com morfologia anormal (CATALDO *et al*, 2010), defeitos na bioenergética (TREVINO *et al*., 2019), na dinâmica mitocondrial (WANG *et al*, 2009) e acúmulo de mutações no mtDNA (STENTON; PROKISCH, 2020) - podem resultar em diversas condições patológicas, como deficiências imunológicas (GARONE; TADESSE; HIRANO, 2011), hepáticas (HELBLING *et al*, 2013), cardiomiopatias (SEBASTIANI *et al*, 2007), declínio cognitivo (KUJOTH *et al*., 2005) e estarem envolvidas com sintomas psiquiátricos (CATALDO *et al*, 2010).

O surgimento, a algumas décadas, da possibilidade de transplante de mitocôndrias funcionais despertou grande interesse no meio científico. Seu princípio terapêutico,

fundamentado na reversão e recuperação da homeostasia mitocondrial, continua sendo uma promissora alternativa terapêutica para o amplo espectro de doenças e traumas que apresentam danos mitocondriais. Diversos foram os trabalhos animadores utilizando o transplante de mitocôndrias *in vitro* e *in vivo* com animais e humanos, principalmente em modelos de dano agudo pulmonar, cardiomiopatias e isquemias cardíacas, doença de Parkinson, câncer e técnicas de fertilização *in vitro*. Ainda assim, pouco avanço foi observado quanto à translação desses benefícios para o âmbito da clínica. Suas dificuldades de optimização são um reflexo do seu caráter incipiente, que carece de métodos e parâmetros padronizados que promovam com a robustez necessária uma técnica confiável e reprodutível. Parte dessa aparente falta de robustez se deve ao atual estado da arte que foca na validação de uma prova de conceito deste procedimento em diversos aspectos dos diferentes modelos de patologias e disfunções celulares. Este capítulo discutirá as possibilidades e desafios do transplante de mitocôndrias. Serão abordadas variáveis metodológicas da mitoterapia, como protocolos de isolamento mitocondrial, tipo de transplante e métodos de medição da terapia, e as necessidades de seu aprimoramento para a implementação clínica da técnica.

2 | TRANSPLANTE DE MITOCÔNDRIAS

A mitoterapia (transplante de mitocôndrias) é uma técnica caracterizada pelo uso de mitocôndrias funcionais isoladas, com subsequente administração das mesmas em pacientes. A internalização dessas organelas por células de mamíferos foi identificada, pela primeira vez, em 1982, por Clark e Shay (CLARK; SHAY, 1982). Diversos estudos pré-clínicos (*in vitro* e *in vivo*) indicam que a transferência de mitocôndrias entre células é um evento fisiológico mediado por junções celulares (ISLAM *et al*, 2012), fusão celular, formação de nanotubos de membrana (WANG; GERDES, 2015) e internalização direta do meio extracelular, e sugerem benefícios protetores e anti-inflamatórios associados.

No entanto, foi apenas no início do século XXI que as possibilidades da mitoterapia realmente despertaram o interesse científico. Em um trabalho fundamental para isso, Katrangi *et al*, em 2007, reportaram a internalização de mitocôndrias de roedor por linhagens de células cancerígenas, resultando em recuperação das taxas respiratórias em células com mtDNA depletado (KATRANGI *et al.*, 2007). A partir disso, foi observada progressiva expansão dos estudos e da diversificação de condições patológicas potencialmente tratadas por essa terapia. Dentre as disfunções para as quais a mitoterapia foi investigada estão a hiper-sensitividade e isquemia pulmonar (SU, *et al., 2016;* MOSKOWITZOVA *et al.*, 2020), as cardiopatias e isquemias cardíacas (EMANI *et al*, 2017; DOULAMIS *et al., 2020*), a nefropatia diabética e nefrotoxicidade (KONARI *et al.*, 2019; ARJMAND *et al.*, 2022), o dano hepático e carcinoma hepatocelular (ZHAO *et al.,* 2020; ZHOU *et al.*, 2022), as disfunções ópticas (NASCIMENTO-DOS-SANTOS *et al*, 2020; AHARONI-SIMON

et al., 2022), o dano neuromuscular periférico e isquemia de membro (ORFANY *et al.*, 2020; ALWAY *et al.*, 2023), tendinopatias (LEE J. *et al.*, 2021), osteoartrite (LEE A. *et al.*, 2022), sepse (ZHANG *et al.*, 2021), reparação de feridas (KIM *et al.*, 2022) e técnicas de fertilização in vitro (OKTAY *et al.*, 2015; LABARTA *et al.*, 2019). Mais especificamente na área de patologias neurais a mitoterapia já foi usada em estudos de isquemia (XIE *et al.*, 2021), trauma (ZHANG *et al.*, 2020) e tumor cerebral (SUN *et al.*, 2019), doença de Parkinson (CHANG *et al*, 2021), lesão da medula espinhal (GOLLIHUE *et al.*, 2017; LIN *et al*, 2022), doença de Alzheimer (NITZAN *et al.*, 2019), esquizofrenia (ROBICSEK *et al.*, 2018), epilepsia (JIA *et al.*, 2022), depressão e ansiedade (JAVANI *et al.*, 2022), e declínio cognitivo (MA *et al.*, 2020; ALEXANDER *et al.*, 2021) (Figura 1).
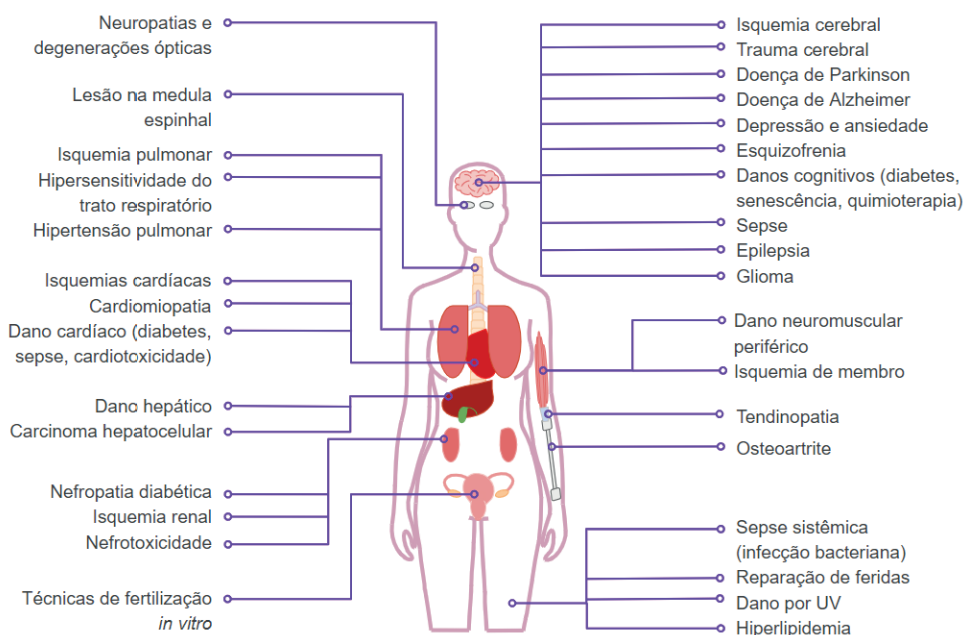
Figura 1 – Principais condições patológicas em estudos de transplante de mitocôndrias. Os exemplos incluem o uso de modelos *in vitro* e *in vivo* (com animais ou humanos).

3 I EFEITOS TERAPÊUTICOS DO TRANSPLANTE DE MITOCÔNDRIAS

Apesar da mitoterapia se apresentar como uma vantajosa possibilidade terapêutica para um vasto número de doenças e traumas, ainda não se conhece de forma satisfatória os mecanismos pelos quais mitocôndrias saudáveis transplantadas exercem seus efeitos terapêuticos e, tampouco, como são controladas suas vias de internalização celular. De forma geral, a administração dessas organelas resulta na reversão total ou parcial do desequilíbrio metabólico, com suprimento das necessidades energéticas (ROBICSEK *et al.*, 2018; XIE *et al.*, 2021), recuperação da integridade celular e tecidual (EMANI *et al*,

2017; ALEXANDER *et al.*, 2021), aprimoramento da morfologia mitocondrial (CHANG *et al.*, 2017), diminuição do estresse oxidativo (KONARI *et al*, 2019; MA *et al.*, 2020), aumento da capacidade de tamponamento de cálcio (ZHOU *et al.*, 2016), alterações na sinalização celular e parácrina (ROBICSEK *et al.*, 2018; KONARI *et al*, 2019), alterações de expressão gênica (ALEXANDER *et al.*, 2021; XIE *et al.*, 2021), diminuição da morte celular (COWAN *et al.*, 2016; XIE *et al.*, 2021) e redução da inflamação (ALEXANDER *et al.*, 2021; CHANG *et al*, 2021) (Figura 2).
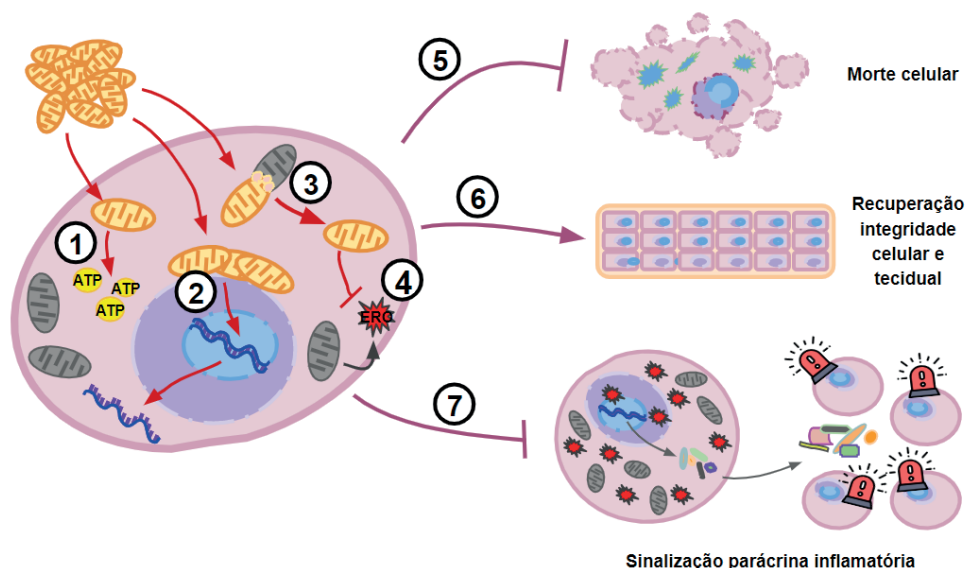
Figura 2 – Principais efeitos intercelulares do transplante de mitocôndrias exógenas. A administração de mitocôndrias exógenas funcionais resulta em: (1) melhora energética; (2) modulação da expressão gênica e sinalização intracelular; (3) fusão das mitocôndrias exógenas com as hospedeiras defeituosas, recuperando a função mitocondrial e a capacidade de tamponamento de cálcio; (4) diminuição dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO); (5) redução da morte celular; (6) recuperação da integridade celular e tecidual e (7) inibição da sinalização parácrina inflamatória.

Certos estudos indicam que tais benefícios ocorrem através da reparação da maquinaria bioenergética, possivelmente se fusionando com mitocôndrias hospedeiras (COWAN *et al.*, 2016; XIE *et al.*, 2021). Outros estudos, observando sua localização perinuclear e as baixas taxas de internalização, sugerem que os benefícios atribuídos às mitocôndrias exógenas se encontram na alteração de mecanismos de sinalização e expressão gênica (ALEXANDER *et al.*, 2021; SHI; GUO; LIU, 2021). O mais provável é que os efeitos terapêuticos observados sejam resultado da combinação de diversos mecanismos.

4 | POTENCIAIS RISCOS

Embora a mitoterapia esteja se mostrando bastante promissora, sua aplicação pode não ser livre de riscos. Dentre as questões mais ressaltadas está o papel das mitocôndrias como fonte de DAMP's (do inglês, *damage-associated molecular patterns*), atuando como mediadores do processo inflamatório quando, no meio extracelular, seus componentes são reconhecidos por receptores específicos em células do sistema imune ou outros tipos celulares (JOSHI *et al*, 2019). Concordando com tais preocupações, certos estudos relataram indícios de resposta inflamatória (GOLLIHUE *et al*., 2018; CHANG *et al*, 2021). Foi reportado aumento na ativação de macrófagos no local da medula espinhal danificada de ratos onde as mitocôndrias foram injetadas (GOLLIHUE *et al*., 2018), resposta imune inata (com atração de macrófagos e microglia) após a injeção de mitocôndrias em modelo ratos isquêmicos (HUANG *et al*., 2016), e resposta inflamatória (com liberação de IL-1α, IL-1β, IL-10, IL-17A) após a infusão intranasal de mitocôndrias em ratos modelos para parkinsonismo (CHANG *et al*, 2021). Em contrapartida, outros artigos apontam para a segurança da técnica (SHIN et al., 2019), não identificando aumento da resposta inflamatória após a adição de mitocôndrias purificadas (MASUZAWA *et al*., 2013; RAMIREZ-BARBIERI *et al*, 2019), considerando-a inclusive como uma possível terapia anti-inflamatória (MOSKOWITZOVA *et al*., 2020; LIN *et al*, 2022). O transplante de mitocôndrias de músculo de ratos em pulmão ou espinha dorsal danificada de animais da mesma espécie reduziu respectivamente a infiltração inflamatória (MOSKOWITZOVA *et al*., 2020) e marcadores inflamatórios como TNF-α, IL-6 e NO (LIN *et al*, 2022). Outro importante exemplo é o estudo clínico em que pacientes pediátricos com disfunções cardíacas receberam injeção de mitocôndrias autólogas purificadas diretamente em seus corações. Esse estudo não reportou efeitos adversos imediatos nem alterações nos marcadores inflamatórios locais ou sistêmicos (EMANI *et al*, 2017).

5 | VARIAÇÕES EXPERIMENTAIS

Em virtude de seu caráter incipiente, a mitoterapia apresenta enorme diversidade quanto aos métodos de isolamento, as fontes doadoras e receptoras de mitocôndrias, as doses terapêuticas e ferramentas de avaliação dos resultados. Outra característica que contribui para essa variabilidade é o próprio princípio do racional terapêutico que propõe o transplante de um material biológico (organelas celulares isoladas) contrastando com o processo de desenvolvimento de fármacos - onde se padroniza com maior facilidade as condições de produção, controle de qualidade e estabilidade do produto que estará disponível para o benefício do paciente. Para o manuseio e administração das mitocôndrias devem-se considerar todas as possíveis particularidades naturais de um ser vivo, com um perfil biológico intrínseco também influenciado por fatores extrínsecos. Em decorrência das diferentes escolhas de técnicas e objetos de estudo, os trabalhos até então publicados

formam uma rede heterogênea de informações a respeito dessa abordagem terapêutica, que dificultam a padronização de parâmetros e métodos que aumentariam a segurança e eficiência da técnica. Os aspectos tecnológicos que necessitam de padronização incluem o método de isolamento, a dose terapêutica, o veículo e via de administração, a duração do tratamento, o tipo de transplante e tecido-fonte de mitocôndrias e métodos de avaliação do efeito terapêutico (Figura 3).
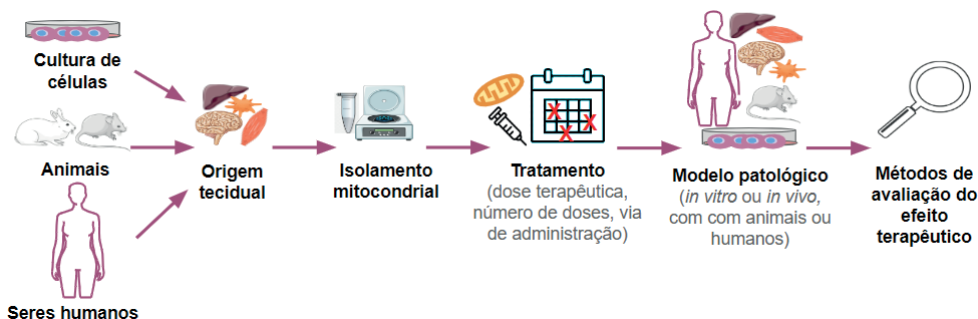
Figura 3 – Aspectos importantes a serem padronizados no aprimoramento da mitoterapia. As variáveis em que os estudos de mitoterapia se deparam incluem: a fonte de mitocôndrias (cultura de células, animais ou seres humanos) e o tipo tecidual; o protocolo de isolamento de mitocôndrias; especificidades do tratamento como dose terapêutica, número de doses e via de administração; o modelo patológico e os métodos de avaliação do efeito terapêutico após o tratamento.

5.1 Transplantes autólogos, alogênicos e xenogênicos

Inúmeros são as fontes de tecidos e tipos celulares, *in vitro* e *in vivo*, que já foram usados para o isolamento de mitocôndrias visando a mitoterapia. *In vivo*, essas organelas já foram isoladas de cérebro (ROBICSEK *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2020), plaquetas (SHI; GUO; LIU , 2021), fígado (KATRANGI *et al.*, 2007; CHANG *et al*, 2021) e músculo esquelético (BLITZER *et al*, 2020; LIN *et al*, 2022). Os três últimos são mais considerados em decorrência de sua relativa facilitada extração, maior quantidade de obtenção de organelas e perfil de suas mitocôndrias (SHI; GUO; LIU, 2021). Estudos mitoterápicos podem realizar tratamentos com mitocôndrias autólogas, alogênicas ou xenogênicas. Tratamentos autólogos - quando as organelas são purificadas a partir do organismo que as recebe - são considerados mais seguros, com maior especificidade e menor risco de possível reconhecimento e rejeição pelo sistema imune (SUN *et al.*, 2019; EMANI *et al*, 2017). Estudos utilizando mitocôndrias alogênicas - provenientes de organismos da mesma espécie - também apresentaram resultados promissores (SUN *et al.*, 2019; CHANG *et al*, 2021; LIN *et al*, 2022). Ainda assim, a translação clínica requer validação sobre eficácia e segurança, especialmente em relação à compatibilidade entre mtDNA doador e recipiente (WANG *et al.*, 2017) e efeito inflamatório (CHANG *et al*, 2021; LIN *et al*, 2022). Por fim, organelas de origem xenogênica - de diferentes espécies - ainda que consideradas

com maior relutância, também parecem demonstrar efeitos positivos, com pouco ou nenhum dano relacionado (SHI *et al*, 2017; NASCIMENTO-DOS-SANTOS, 2020). Um grande benefício da estratégia xenogênica para estudos mitoterápicos é a facilidade de monitoramento das organelas exógenas no organismo hospedeiro, pois podem ser usados anticorpos específicos (MOSKOWITZOVA *et al.*, 2020; ALEXANDER *et al.*, 2021).

5.2 Taxa de internalização

A internalização de mitocôndrias, ainda que não completamente elucidada, já foi observada em estudos envolvendo modelos *in vitro*, animais (COWAN *et al.*, 2016; BLITZER *et al*, 2020) e seres humanos (EMANI *et al*, 2017). Os principais mecanismos candidatos são a endocitose (KATRANGI *et al.*, 2007) mediada pelas proteínas clatrina e dinamina (PERUZZOTTI-JAMETTI *et al.*, 2021) ou por actina e macropinocitose (KITANI *et al.*, 2014). Diferentes tipos celulares possuem perfis de expressão da maquinaria endocítica próprios, que refletem em diferentes tempos de incubação das mitocôndrias com as células para a obtenção do efeito terapêutico. Por exemplo, no sistema nervoso as taxas de internalização de mitocôndrias são cerca de 40-50% em neurônios e astrócitos, 0-10% em oligodendrócitos e 70% em micróglias, refletindo a função de cada tipo celular (ZHAO, *et al.*, 2021). Já mitocôndrias provenientes de músculo esquelético ou cardíaco costumam apresentar semelhantes taxas de internalização (WEIXLER *et al.*, 2020). Alguns trabalhos reportaram baixas taxas de internalização de mitocôndrias exógenas, com variações de eficácias de 3-15% (MA *et al.*, 2020; SHI; GUO; LIU, 2021), 15-30% (KITANI *et al.*, 2014; HUANG *et al.*, 2016) e 50% (ROBICSEK *et al.*, 2018). Um fator que pode aumentar a taxa de internalização é o estresse celular das células receptoras (BABENKO *et al.*, 2018 SUN *et al.*, 2019). Ainda assim, outros afirmam que não encontraram tal associação (HUANG *et al.*, 2016; SHI; GUO; LIU, 2021). De forma geral, injeções intravenosas costumam apresentar boa distribuição sistêmica de internalização de mitocôndrias (SHI *et al.,* 2017), e injeções locais costumam demonstrar satisfatória concentração das organelas no local danificado (GUARIENTO *et al.*, 2020). Diversos estudos também testaram estratégias para aumentar a internalização de mitocôndrias e direcioná-las para o local desejado (BABENKO *et al.*, 2018; SUN *et al.*, 2023), ligando-as à polipeptídeos da família dos penetradores de células, como Pep-1 (CHANG *et al.*, 2021), ao polímero dextran conjugado com TAT (MAEDA *et al.,* 2020) ou TPP (WU *et al.*, 2018), ou através de centrifugação (KIM *et al.*, 2018),

5.3 Protocolos de isolamento mitocondrial

O processo de isolamento de mitocôndrias é uma etapa fundamental para a capacidade terapêutica da mitoterapia. Ainda que seus fundamentos se mantenham na maioria dos protocolos utilizados, grande é a variação de certos aspectos - influenciada, por exemplo, pelo tipo celular doador de mitocôndrias. Preferencialmente, todo o processo de isolamento deve ser feito em temperatura de 4ºC, contribuindo para a preservação da

viabilidade e função mitocondrial (GOLLIHUE *et al.*, 2017; PAMENTER; LAU; RICHARDS, 2018). O isolamento de tecidos inicia na separação das células com a lise mecânica e utilização da tripsina (NASCIMENTO-DOS-SANTOS *et al*, 2020; CHANG *et al*, 2021). O isolamento de mitocôndrias a partir de células em cultura inicia com o destacamento das células - com tripsina (SHI *et al*, 2017; KONARI *et al*, 2019) ou raspadores mecânicos (GOLLIHUE *et al.*, 2018; WU *et al.*, 2018). Apesar da tripsina garantir maior rendimento, seus resíduos, potencialmente danosos, foram encontrados no pellet mitocondrial (GOLLIHUE *et al.*, 2017). De forma geral, ocorrem centrifugações com variação na velocidade para obter purificações seriadas, intercaladas pela lise celular mecânica (GOLLIHUE *et al.*, 2018; CHANG *et al*, 2021) ou química (SUN *et al.*, 2019). A lise mecânica utiliza de homogeneizadores automáticos (COWAN *et al.*, 2016; CHANG *et al*, 2021) ou manuais, que costuma promover a lise celular com 15 a 30 *strokes* (KITANI *et al.*, 2014; MAEDA *et al.*, 2020). Alguns estudos incubam as células em tampão hipotônico para promover o extravasamento celular com a diminuição da osmolaridade. Depois da lise, a osmolaridade da solução é balanceada (isotônica) adicionando tampão hipertônico (PATEL *et al.*, 2017; PERUZZOTTI-JAMETTI *et al.*, 2021). Para aumentar a purificação, alguns artigos fazem lise em câmara de N_2 (GOLLIHUE *et al.*, 2017), filtram o isolado (COWAN *et al.*, 2016; AHARONI-SIMON *et al.*, 2022), utilizam técnicas de gradiente de Ficoll (GOLLIHUE *et al.*, 2017; GOLLIHUE *et al.*, 2018) ou Percoll (ROBICSEK *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2020), ou associam as organelas com *microbeads* para subsequente separação magnética (MACHEINER *et al.*, 2016). Depois do processo de isolamento, para evitar perdas na viabilidade, as organelas podem ser mantidas em gelo por até 3-4 horas (PATEL *et al.*, 2017; BLITZER *et al*, 2020). Ainda assim, alguns estudos testaram com sucesso mitocôndrias armazenadas, em solução baseada em aminoácidos, por até 3 dias (LIN *et al.*, 2023), ou até 1 ano, congeladas em - 80 ºC. Estas últimas, quando comparadas com mitocôndrias frescas apresentaram semelhantes morfologias e capacidades funcionais (CLOER *et al.*, 2023). O estabelecimento de um método adequado de armazenamento de mitocôndrias é fundamental para o suporte clínico. A análise do isolado costuma identificar organelas com potencial de membrana estável e morfologias saudáveis - indicando funcionalidade (COWAN *et al.*, 2016; HUANG *et al.*, 2016). É fundamental, após a escolha do método e padronização/otimização desse, considerar não só a quantidade de mitocôndrias isoladas, mas também a sua qualidade determinada pela avaliação da sua taxa respiratória (GOLLIHUE *et al.*, 2017).

5.4 Estratégias para avaliação da funcionalidade e potencial terapêutico de mitocôndrias isoladas

Diversas são as técnicas empregadas para avaliação da capacidade respiratória, integridade, potencial de membrana e capacidade terapêutica de mitocôndrias isoladas. No entanto, as variações desses protocolos e ferramentas podem impactar nos resultados

e em sua interpretação. Estudos de mitoterapia costumam avaliar, por exemplo, a quantidade de mitocôndrias obtidas com o isolamento (HUANG *et al*., 2016; SHI *et al*, 2017), a internalização de mitocôndrias exógenas e sua qualidade, por microscopia confocal (CHANG *et al*., 2017; ROBICSEK *et al*., 2018), imunohistoquímica (ZHOU *et al*., 2016; CHANG *et al*, 2021) ou microscopia eletrônica de transmissão (KITANI *et al*., 2014) que permite a visualização da morfologia, incluindo o estado de cristais e membranas mitocondriais (CHANG *et al*., 2017; KIM *et al*, 2018). Para a análise da funcionalidade das mitocôndrias isoladas ou das mitocôndrias presentes nas células receptoras, podem ser mensurados: produção de ATP (SHI *et al*, 2017; KIM *et al*., 2018), ROS (KONARI *et al*, 2019; SHI; GUO; LIU, 2021), capacidade de tamponamento de cálcio (ZHOU *et al*., 2016; SHI *et al*, 2017) ou taxa de consumo de oxigênio por sondas fluorescentes (com equipamentos como *Seahorse*™) (SUN *et al*., 2019), métodos polarográficos específicos para detecção de oxigênio como o eletrodo de Clark (*Clark Oxygen Electrode)* (ROBICSEK *et al*., 2018) e seu aprimoramento em alta resolução (*Oroboros*™) (NASCIMENTO-DOS-SANTOS *et al*, 2020; PERUZZOTTI-JAMETTI *et al*., 2021). A marcação mitocondrial é um aspecto essencial para os estudos mitoterápicos, possibilitando a visualização e acompanhamento da internalização (GOLLIHUE *et al*., 2018). Os marcadores mitocondriais podem ser divididos entre independentes ou dependentes de voltagem, como o JC-1 (iodeto 15 de 5,5´,6,6´-tetracloro-1,1,3,3´tetraetilbenzimidazolilcarbocianina) (SUN *et al*., 2019; ZHANG *et al*., 2020), que pode indicar o potencial de membrana mitocondrial (ROBICSEK *et al*., 2018; XIE *et al*., 2021). Ainda, podem ser utilizados marcadores transgênicos (KONARI *et al*, 2019; MAEDA *et al*., 2020), fluorescentes (HUANG *et al*., 2016; AHARONI-SIMON *et al*., 2022) ou de análogos de nucleotídeos tipo bromodesoxiuridina (BrdU) (HUANG *et al*., 2016; CHANG *et al*, 2021). Uma estratégia muito usada, por exemplo, é a aplicação concomitante de mais de um marcador – um para organelas hospedeiras e outro para transplantadas (KIM *et al*., 2018; SHI; GUO; LIU, 2021).

6 I CONCLUSÃO

A discussão das estratégias, do racional terapêutico e dos desafios no estudo da mitoterapia é fundamental para a identificação das necessidades de aprimoramento da técnica. Os aspectos metodológicos que impactam na capacidade de reversão do estresse celular incluem dose mitocondrial e duração da terapia, tipo de transplante, tecido-fonte de organelas, e métodos de avaliação terapêutica. Ainda, a questão das mitocôndrias serem um material terapêutico biológico dificulta os processos de preservação e armazenamento até a sua aplicação. Desse modo, o desenvolvimento de estratégias de conservação da viabilidade mitocondrial, como congelamento ou liofilização, poderá impactar positivamente na utilização em ampla escala da mitoterapia. Tais variáveis influenciam a confiabilidade e reprodutibilidade, e dificultam a obtenção de resultados robustos que viabilizarão com maior

eficiência a translação clínica do transplante de mitocôndrias. Mais estudos são necessários para garantir a padronização e análise comparativa dos métodos. A mitoterapia continua sendo uma estratégia promissora para o tratamento de diversas condições patológicas, resta, porém, saber quando e se essa promessa conseguirá trazer benefícios reais para os pacientes humanos.

REFERÊNCIAS

AHARONI-SIMON, M. *et al*. Oxidative stress facilitates exogenous mitochondria internalization and survival in retinal ganglion precursor-like cells. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 5122, 2022.

ALEXANDER, J. F. *et al*. Nasal administration of mitochondria reverses chemotherapy-induced cognitive deficits. **Theranostics**, [s. l.], v. 11, n. 7, p. 3109–3130, 2021.

ALWAY, S. E., *et al*. Mitochondria transplant therapy improves regeneration and restoration of injured skeletal muscle. **Journal of cachexia, sarcopenia and muscle**. 14(1), 493–507. 2023.

ARJMAND, A., *et al*. Mitochondrial transplantation against gentamicin-induced toxicity on rat renal proximal tubular cells: the higher activity of female rat mitochondria. **In vitro cellular & developmental biology. Animal**, 59(1), 31–40. 2023.

BABENKO, V. *et al*. Miro1 Enhances Mitochondria Transfer from Multipotent Mesenchymal Stem Cells (MMSC) to Neural Cells and Improves the Efficacy of Cell Recovery. **Molecules**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 687, 2018.

BLITZER, D., *et al*. Delayed Transplantation of Autologous Mitochondria for Cardioprotection in a Porcine Model. **Ann Thorac Surg**, vol. 109,3 (2020): 711-719.

CATALDO, A. *et al*. Abnormalities in mitochondrial structure in cells from patients with bipolar disorder. **The American journal of pathology** vol. 177,2 (2010): 575-85.

CHANG, J.-C. *et al*. Peptide-mediated delivery of donor mitochondria improves mitochondrial function and cell viability in human cybrid cells with the MELAS A3243G mutation. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 10710, 2017.

CHANG, J.-C., *et al*. Intranasal delivery of mitochondria for treatment of Parkinson's Disease model rats lesioned with 6-hydroxydopamine. **Scientific Reports**, [s. l.], p. 14, 2021.

CLARK, M. A.; SHAY, J. W. Mitochondrial transformation of mammalian cells. **Nature**, [s. l.], v. 295, n. 5850, p. 605–607, 1982.

CLOER, C. M., *et al*. Mitochondrial transplant after ischemia reperfusion promotes cellular salvage and improves lung function during ex-vivo lung perfusion. **The Journal of heart and lung transplantation: the official publication of the International Society for Heart Transplantation**, S1053-2498(23)00002-5. 2023.

COWAN, D. B. *et al*. Intracoronary Delivery of Mitochondria to the Ischemic Heart for Cardioprotection. **PLOS ONE**, [s. l.], p. 19, 2016.

DAUM, G. Lipids of mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes.** Vol. 822, Issue 1, 1-42, 1985.

DOULAMIS, I. P., *et al*. Mitochondrial transplantation for myocardial protection in diabetic hearts. **European journal of cardio-thoracic surgery: official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery**. 57(5), 836–845. 2020.

EMANI, S. M *et al*. Autologous mitochondrial transplantation for dysfunction after ischemia-reperfusion injury. **The Journal of thoracic and cardiovascular surgery** vol. 154,1 (2017): 286-289.

GARONE, C., TADESSE, S., HIRANO, M. Clinical and genetic spectrum of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. **Brain: A Journal of Neurology**. [s. l.], v. 134, n. Pt 11, p. 3326–3332, 2011.

GOLLIHUE, J. L. *et al*. Effects of Mitochondrial Transplantation on Bioenergetics, Cellular Incorporation, and Functional Recovery after Spinal Cord Injury. **Journal of neurotrauma** vol. 35,15 (2018): 1800-1818.

GOLLIHUE, J. L. *et al*. Optimization of Mitochondrial Isolation Techniques for Intraspinal Transplantation Procedures. **Journal of neuroscience methods** vol. 287 (2017): 1-12.

GUARIENTO, A., *et al*. Mitochondrial transplantation for myocardial protection in ex-situ-perfused hearts donated after circulatory death. **The Journal of heart and lung transplantation: the official publication of the International Society for Heart Transplantation**, 39(11), 1279–1288. 2020.

HELBLING, D. *et al*. Reduced mitochondrial DNA content and heterozygous nuclear gene mutations in patients with acute liver failure. **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition.** Vol. 57,4 (2013): 438-43.

HUANG, P.-J. *et al*. Transferring Xenogenic Mitochondria Provides Neural Protection against Ischemic Stress in Ischemic Rat Brains. **Cell Transplantation**, [s. l.], v. 25, n.m 5, p. 913–927, 2016.

ISLAM, MN., *et al*. Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury. **Nature medicine**. vol. 18,5 759-65. 15 Apr. 2012.

JAVANI, G., *et al*. Mitochondrial transplantation improves anxiety- and depression-like behaviors in aged stress-exposed rats. **Mechanisms of ageing and development**. 202, 111632. 2022.

JIA, X., *et al*. Mitochondrial transplantation ameliorates hippocampal damage following status epilepticus. **Animal models and experimental medicine**. 6(1), 41–50. 2023.

JOSHI, AU., *et al*. Fragmented mitochondria released from microglia trigger A1 astrocytic response and propagate inflammatory neurodegeneration. **Nature neuroscience**. vol. 22,10 (2019): 1635-1648.

JOUAVILLE, LS. *et al*. Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: evidence for a long-term metabolic priming. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. vol. 96,24 (1999): 13807-12.

KAPPLER, L. *et al*. Linking Bioenergetic Function Of Mitochondria To Tissue-Specific Molecular Fingerprints. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**. 317, E374-E378. 2019.

KATRANGI, E. *et al*. Xenogenic Transfer of Isolated Murine Mitochondria into Human ρ^0 Cells Can Improve Respiratory Function. **Rejuvenation Research**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 561–570, 2007.

KIM, M.J. *et al*. Delivery of exogenous mitochondria via centrifugation enhances cellular metabolic function. **Scientific Reports**, [s. l.], p. 13, 2018.

KIM, S., *et al*. Platelet-derived mitochondria transfer facilitates wound-closure by modulating ROS levels in dermal fibroblasts. **Platelets**. 34(1), 2151996. 2022.

KITANI, T. *et al*. Internalization of isolated functional mitochondria: involvement of macropinocytosis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, [s. l.], v. 18, n. 8, p. 1694–1703, 2014.

KONARI, N., *et al*. Mitochondria transfer from mesenchymal stem cells structurally and functionally repairs renal proximal tubular epithelial cells in diabetic nephropathy in vivo. **Scientific reports** vol. 9,1 5184. 26 Mar. 2019.

KUJOTH, G. C. *et al*. Mitochondrial DNA Mutations, Oxidative Stress, and Apoptosis in Mammalian Aging. **Science**, [s. l.], v. 309, n. 5733, p. 481–484, 2005.

LABARTA, E. *et al*. Autologous mitochondrial transfer as a complementary technique to intracytoplasmic sperm injection to improve embryo quality in patients undergoing in vitro fertilization—a randomized pilot study. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 111, n. 1, p. 86–96, 2019.

LEE, J.M., *et al*. Mitochondrial Transplantation Modulates Inflammation and Apoptosis, Alleviating Tendinopathy Both In Vivo and In Vitro. **Antioxidants**. *10*, 696. 2021.

LEE, A. R., *et al*. Mitochondrial Transplantation Ameliorates the Development and Progression of Osteoarthritis. **Immune network**. *22*(2), e14. 2022.

LI, MX., DEWSON, G. Mitochondria and apoptosis: emerging concepts. **F1000Prime Reports**. vol. 7 42. 1 Apr. 2015.

LIN, M-W., *et al*. Mitochondrial Transplantation Attenuates Neural Damage and Improves Locomotor Function After Traumatic Spinal Cord Injury in Rats. **Frontiers in Neuroscience**, vol. 16 800883. 12 Apr. 2022.

LIN, Z. J., *et al*. Human platelet mitochondria improve the mitochondrial and cardiac function of donor heart. **Pflugers Archiv: European journal of physiology**, *475*(2), 267–275. 2023

MA, H. *et al*. Transplantation of platelet-derived mitochondria alleviates cognitive impairment and mitochondrial dysfunction in db/db mice. **Clinical Science (London, England: 1979)**, [s. l.], v. 134, n. 16, p. 2161–2175, 2020.

MACHEINER, T. *et al*. Magnetomitotransfer: An efficient way for direct mitochondria transfer into cultured human cells. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 35571, 2016.

MAEDA, H. *et al*. TAT-dextran–mediated mitochondrial transfer enhances recovery from models of reperfusion injury in cultured cardiomyocytes. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, [s. l.], v. 24, n. 9, p. 5007–5020, 2020.

MASUZAWA, A. *et al*. Transplantation of autologously derived mitochondria protects the heart from ischemia-reperfusion injury. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, [s. l.], v. 304, n. 7, p. H966–H982, 2013.

MOSKOWITZOVA, K. *et al*. Mitochondrial transplantation enhances murine lung viability and recovery after ischemia-reperfusion injury. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology** vol. 318,1 (2020): L78-L88.

NASCIMENTO-DOS-SANTOS, G., *et al*. Neuroprotection from optic nerve injury and modulation of oxidative metabolism by transplantation of active mitochondria to the retina. **Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease** vol. 1866,5 (2020): 165686.

NITZAN, K., *et al*. Mitochondrial Transfer Ameliorates Cognitive Deficits, Neuronal Loss, and Gliosis in Alzheimer's Disease Mice. **Journal of Alzheimer's disease: JAD**, *72*(2), 587–604. 2019.

OKTAY, K. *et al*. Oogonial Precursor Cell-Derived Autologous Mitochondria Injection to Improve Outcomes in Women With Multiple IVF Failures Due to Low Oocyte Quality: A Clinical Translation. **Reproductive Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 12, p. 1612–1617, 2015.

ORFANY, A., *et al*. Mitochondrial transplantation ameliorates acute limb ischemia. **Journal of vascular surgery**. *71*(3), 1014–1026. 2020.

PAMENTER, ME., LAU, GY., RICHARDS, JG. Effects of cold on murine brain mitochondrial function. **PloS one.** Vol. 31,12 e0208453. 6 Dec. 2018.

PATEL, D. *et al*. Macropinocytic entry of isolated mitochondria in epidermal growth factor-activated human osteosarcoma cells. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 12886, 2017.

PERUZZOTTI-JAMETTI, L. *et al*. Neural stem cells traffic functional mitochondria via extracellular vesicles. **PLOS BIOLOGY**. vol. 19,4 e3001166. 7 Apr. 2021.

RAMIREZ-BARBIERI, G. *et al*. Alloreactivity and allorecognition of syngeneic and allogeneic mitochondria. **Mitochondrion**. vol. 46 (2019): 103-115.

ROBICSEK, O. *et al*. Isolated Mitochondria Transfer Improves Neuronal Differentiation of Schizophrenia-Derived Induced Pluripotent Stem Cells and Rescues Deficits in a Rat Model of the Disorder. **Schizophrenia bulletin**. vol. 44,2 (2018): 432-442.

SCHWARTZ, R. M.; DAYHOFF, M. O. Origins of prokaryotes, eukaryotes, mitochondria, and chloroplasts. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 199, n. 4327, p. 395–403, 1978.

SEBASTIANI, M., *et al*. Induction of mitochondrial biogenesis is a maladaptive mechanism in mitochondrial cardiomyopathies. **Journal of the American College of Cardiology**. vol. 50,14 (2007): 1362-9.

SHI, X., *et al*. Intravenous administration of mitochondria for treating experimental Parkinson's disease. **Mitochondrion** vol. 34 (2017): 91-100.

SHI, C.; GUO, H.; LIU, X. Platelet Mitochondria Transplantation Rescues Hypoxia/Reoxygenation-Induced Mitochondrial Dysfunction and Neuronal Cell Death Involving the FUNDC2/PIP3/Akt/FOXO3a Axis. **Cell Transplantation**, [s. l.], v. 30, p. 096368972110242, 2021.

SHIN, B., *et al*. A Novel Biological Strategy for Myocardial Protection by Intracoronary Delivery of Mitochondria: Safety and Efficacy. **JACC. Basic to translational science**, *4*(8), 871–888. 2019.

STENTON, SL., PROKISCH, H. Genetics of mitochondrial diseases: Identifying mutations to help diagnosis. **EBioMedicine**. vol. 56 (2020): 102784.

SU, Y., *et al*. Mitochondrial Transplantation Attenuates Airway Hyperresponsiveness by Inhibition of Cholinergic Hyperactivity. **Theranostics.** *6*(8), 1244–1260. 2016.

SUN, C. *et al*. Endocytosis-mediated mitochondrial transplantation: Transferring normal human astrocytic mitochondria into glioma cells rescues aerobic respiration and enhances radiosensitivity. **Theranostics** vol. 9,12 3595-3607. 26 May. 2019.

SUN, X*., et al.* Intravenous Transplantation of an Ischemic-specific Peptide-TPP-mitochondrial Compound Alleviates Myocardial Ischemic Reperfusion Injury. **ACS nano***, 17(2), 896–909.* 2023.

TREVINO, M. B. *et al*. Loss of mitochondrial energetics is associated with poor recovery of muscle function but not mass following disuse atrophy. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. 317, n. 5, p. E899–E910, 2019.

XIE, Q. *et al*. Mitochondrial Transplantation Attenuates Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury: Possible Involvement of Mitochondrial Component Separation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2021, p. 1–21, 2021.

WANG, X. *et al*. The role of abnormal mitochondrial dynamics in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Journal of neurochemistry**. vol. 109 Suppl 1,Suppl 1 (2009): 153-9.

WANG, X.; GERDES, H.-H. Transfer of mitochondria via tunneling nanotubes rescues apoptotic PC12 cells. **Cell Death and Differentiation**, [s. l.], v. 22, n. 7, p. 1181–1191, 2015.

WANG, Z.-B. *et al*. Transfer of autologous mitochondria from adipose tissue-derived stem cells rescues oocyte quality and infertility in aged mice. **Aging**, [s. l.], v. 9, n. 12, p. 2480–2488, 2017.

WEIXLER, V., *et al.* Autogenous mitochondria transplantation for treatment of right heart failure. **The Journal of thoracic and cardiovascular surgery**, *162*(1), e111–e121. 2021.

WU, S. *et al*. Polymer Functionalization of Isolated Mitochondria for Cellular Transplantation and Metabolic Phenotype Alteration. **Advanced Science**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 1700530, 2018.

ZHANG, B. *et al*. Effects of Brain-Derived Mitochondria on the Function of Neuron and Vascular Endothelial Cell After Traumatic Brain Injury. **World Neurosurgery**, [s. l.], v. 138, p. e1–e9, 2020.

ZHANG, Z., *et al*. Muscle-Derived Mitochondrial Transplantation Reduces Inflammation, Enhances Bacterial Clearance, and Improves Survival in Sepsis. **Shock** *(Augusta, Ga.)*, *56*(1), 108–118. 2021.

ZHAO, Z., *et al*. Mitochondrial transplantation therapy inhibit carbon tetrachloride-induced liver injury through scavenging free radicals and protecting hepatocytes. **Bioengineering & translational medicine**. *6*(2), e10209. 2020.

ZHAO, J., *et al.* Mitochondria transplantation protects traumatic brain injury via promoting neuronal survival and astrocytic BDNF. **Translational research: the journal of laboratory and clinical medicine**, *235*, 102–114. 2021.

ZHOU, J. *et al*. Mitochondrial transplantation attenuates hypoxic pulmonary vasoconstriction. **Oncotarget**. 2016 May 24;7(21):31284-98.

ZHOU, W., *et al*. Mitochondrial transplantation therapy inhibits the proliferation of malignant hepatocellular carcinoma and its mechanism. **Mitochondrion**. *65*, 11–22. 2022.

CAPÍTULO 3

ETNOBOTÂNICA E ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE VARIEDADES DE MANDIOCA CULTIVADAS EM POCONÉ, MATO GROSSO

Data de submissão: 09/03/2023 *Data de aceite: 02/05/2023*

Juliana Larrosa Rodrigues Oler
Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá
Tefé – Amazonas
https://orcid.org/0000-0003-3910-4256
http://lattes.cnpq.br/3514475634759966

Eulalia Soler Sobreira Hoogerheide
Embrapa Agrossilvipastoril
Sinop - Mato Grosso
https://orcid.org/0000-0003-0944-3898
http://lattes.cnpq.br/8497096021170936

Auana Vicente Tiago
Embrapa Agrossilvipastoril
Sinop - Mato Grosso
https://orcid.org/0000-0001-9556-9491
http://lattes.cnpq.br/3112795576497501

Joyce Mendes Andrade Pinto
Embrapa Agrossilvipastoril
Sinop - Mato Grosso
https://orcid.org/0000-0002-9484-1868
http://lattes.cnpq.br/1074850228482483

RESUMO: A região denominada Baixada Cuiabana é uma das poucas regiões do Mato Grosso que preserva as antigas características de comunidades de agricultores de subsistência que mantêm expressiva diversidade de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). O objetivo deste estudo foi caracterizar a diversidade genética de mandiocas mediante o conhecimento etnobotânico e marcadores microssatélites para compreender a dinâmica de conservação e manejo do acervo usado pelos agricultores da Comunidade São Benedito, Poconé, Mato Grosso. Para o inventário etnobotânico foram aplicadas entrevistas semiestruturadas em 10 unidades domésticas para obter informações sobre as mandiocas cultivadas, e das 11 variedades locais cultivadas foi realizada análise por marcadores microssatélites. Apesar da baixa diversidade etnobotânica (H'=2,05), foi encontrada alta heterozigosidade observada (Ho = 0,92) e diversidade gênica (He = 0,75). Os agricultores que sobrevivem basicamente do cultivo da mandioca e produção de farinha para comercialização, direcionam suas escolhas de variedades para as mais produtivas e menos suscetíveis ao ataque de pragas. A variedade *Brava* foi a mais frequente (80% das roças) e é apontada como a mais rentável para a produção de farinha, sendo uma importante fonte de recurso genético para programas de melhoramento. Através da análise

de rede pode-se observar que a rede de circulação de propágulos e informações ocorre entre os moradores e também com outras comunidades da região. Dois agricultores foram identificados como os mais atuantes nas trocas. De acordo com o agrupamento e análise de coordenadas principais feitos utilizando os dados genéticos, as variedades introduzidas mais recentemente separam-se das introduzidas há mais tempo. Os resultados apontam que as variedades possuem uma alta diversidade genética entre si, porém os agricultores da comunidade apresentam baixa diversidade etnobotânica quando comparada a outras comunidades.
PALAVRAS-CHAVE: Microssatélites; conservação *on farm*; conhecimento tradicional.

ETHNOBOTANY AND GENETIC DIVERSITY ANALYSIS OF CASSAVA VARIETIES CULTIVATED IN POCONÉ, MATO GROSSO

ABSTRACT: The region called Baixada Cuiabana is one of the few regions of Mato Grosso that preserves the ancient characteristics of subsistence farming communities that maintain a significant diversity of cassava (Manihot esculenta Crantz). The objective of this study was to characterize the genetic diversity of cassava through ethnobotanical knowledge and microsatellite markers to understand the dynamics of conservation and management of the collection used by farmers in the São Benedito Community, Poconé, Mato Grosso. For the ethnobotanical inventory, semi-structured interviews were applied in 10 household units to obtain information about the cassava grown, and of the 11 local varieties grown, analysis was performed by microsatellite markers. Despite the low ethnobotanical diversity (*H'*=2.05), high observed heterozygosity (*Ho* = 0.92) and gene diversity (*He* = 0.75) were found. Farmers who survive basically on the cultivation of cassava and production of flour for commercialization, direct their choices of varieties to the most productive and less susceptible to pest attack. The variety Brava was the most frequent (80% of the farms) and is pointed out as the most profitable for flour production, being an important source of genetic resource for improvement programs. Through the network analysis it can be observed that the network of circulation of propagules and information occurs among the residents and also with other communities in the region. Two farmers were identified as the most active in the exchanges. According to the clustering and principal coordinates analysis done using the genetic data, the most recently introduced varieties are separated from those introduced longer ago. The results indicate that the varieties have a high genetic diversity among themselves, but the farmers in the community have low ethnobotanical diversity when compared to other communities.
KEYWORDS: Microsatellites; on-farm conservation; traditional knowledge.

1 I INTRODUÇÃO

Os agricultores tradicionais são apontados por muitos autores como os principais mantenedores da agrobiodiversidade, inclusive de mandioca (AMOROZO, 2013). Em geral, os agricultores tradicionaistem laços de parentescoe um alto grau de conhecimento, transmitido de geração para geração, do ambiente onde vivem. As plantas manejadas na agricultura tradicional são essenciais à continuidade das comunidades, pois fornecem a base alimentar do grupo (AMOROZO, *et al.*, 2002).

Considerada como espécie-chave, a mandioca desenvolve importante função na segurança alimentar e autonomia de populações que praticam agricultura de subsistência e com pouca capacidade de aquisição de insumos externos, devido a uma série de vantagens em relação a outros cultivos, como tolerância a estiagem, fácil propagação, rendimento satisfatório mesmo em solos pouco férteis e alta diversidade intraespecífica (CAGNON *et al*., 2002; PERONI e HANAZAKI, 2002).

Muitos estudos destacam a elevada diversidade de variedades locais de mandioca cultivada por agricultores tradicionais em diferentes locais do Brasil (AMOROZO, 2010; EMPERAIRE e PERONI 2007; MARCHETTI *et al*., 2013) sendo também comprovada a alta diversidade genética manejada nas comunidades tradicionais (ALVES-PEREIRA et al., 2012; SALICK *et al*., 1997; SIQUEIRA *et al*., 2010).

A região denominada Baixada Cuiabana fica ao norte do Pantanal Mato-Grossense, sendo uma das poucas regiões em Mato Grosso que ainda preserva as antigas características de comunidades de agricultores de subsistência, e ocupa secularmente área de sesmarias e apresenta comunidades tradicionais de pequenos agricultores que mantêm expressiva diversidade de mandioca e outros cultivos (AMOROZO, 2010).

Assim, para este trabalho foram aplicadas ferramentas etnobotânicas e técnicas moleculares para entender as relações dos agricultores com o acervo de mandioca por eles manejada e conservada. Considerando o panorama apresentado, o presente estudo teve por objetivo caracterizar a diversidade genética da mandioca mediante o conhecimento etnobotânico/tradicional do acervo e marcadores microssatélites para compreender a dinâmica de conservação e manejo do acervo usado pelos agricultores da Comunidade São Benedito, Poconé, Mato Grosso.

2 I MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de estudo

O estudo foi realizado do município de Poconé, Mato Grosso, Brasil, localizado a 100 quilômetros da capital do Estado, Cuiabá, pertencente ao território da cidadania da Baixada Cuiabana.

A comunidade São Benedito (S16 00 54.6 W56 59 11.2) foi estabelecida na atual área na década de 50, e reconhecida como remanescentes de quilombo em 2010. Atualmente encontra-se na terceira geração que mantém a atividade agrícola. Nela vivem 81 moradores distribuídos em 23 unidades familiares. A renda familiar é basicamente da agricultura de subsistência e produção de farinha de mandioca (DUARTE *et al*., 2016).

2.1.1 Coleta de dados

A pesquisa foi realizada entre setembro a dezembro de 2015. Foram aplicadas

entrevistas semiestruturadas etnobotânicas (VIERTLER, 2002) aos 10 agricultores (AGRA; AGRB; AGRC; AGRD; AGRE; AGRF; AGRG; AGRH; AGRI; AGRJ) que cultivam mandioca. Vale ressaltar que se entende como variedade local o conjunto de clones agrupados pelos agricultores como uma única variedade devido as semelhanças fenotípicas que apresentam (ELIAS *et al*., 2004).

O presente trabalho foi autorizado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN-MMA. Processo nº 02000.003025/2013-13 – MMA deliberada em 28 de abril de 2015 e publicada no D.O.U de 13 de julho de 2015), e está cadastrada no Sisgen com a numeração A3DF14E.

2.1.2 Caracterização molecular

As roças foram visitadas e coletadas as folhas recém expandidas. Para tal, duas folhas de cada variedade local (11) foram obtidas e transportadas em microtubos de polipropileno de 1.5 mL, contendo 1 mL de solução saturada de NaCl-CTAB (6 M NaCl, 40 mM CTAB) para o Laboratório de Fitoquímica da Embrapa Agrossilvipastoril, Sinop, Mato Grosso, e mantido durante sete dias a temperatura de -4°C. A diversidade genética foi determinada com os marcadores moleculares do tipo microssatélites (SSR).

O DNA das 11 amostras foi extraído de acordo com a metodologia proposta por Doyle e Doyle (1990), com as alterações descritas por Siqueira *et al.* (2009). Através de eletroforese em gel de agarose 0.8% foram obtidas as concentrações de DNA das soluções estoque de cada indivíduo. As bandas foram visualizadas utilizando o corante SYBR Green e para a quantificação das amostras de DNA foram utilizadas soluções padrões de DNA (20, 40, 80 ng) (CARRASCO *et al*., 2016). Para quantificação utilizou-se leituras em espectrofotômetro Thermo Scientific Nanodrop 2000, e a qualidade do material genético foi verificada em gel de agarose 0.8%. Foram utilizados doze locos de marcadores microssatélites escolhidos com base em Chavarriaga-Aguirre *et al*. (1998) e Mba *et al*. (2001).

As amplificações foram realizadas seguindo o protocolo de Schuelke, (2000) com a adição de uma cauda de M13 na extremidade 5’ no forward primer, e a fluorescência escolhida foi acoplada a esse primer (HEX ou FAM). As reações continham 10-50ng de DNA genômico, 0,6 ou 0,7 mM $MgCl_2$, 1x tampão, 0,2 mM de cada dNTP 0,25 uL primer forward e 0,5 uL para o primer reverse; 0,25pmol cauda universal M13 (0,25 pmol) e 1,25 U Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, California). O programa de amplificação consistiu em desnaturação a 94ºC por 5 minutos, seguido por 30 ciclos de 30 s a 94° C, 45 s a 45°C, 45 s a 72°C e 8 ciclos de 30 s a 94° C, 45 s a 53°C, 45 s a 72°C.

As reações foram enviadas para São Paulo e genotipadas em sequenciador automático modelo ABI3730 no Setor de Sequenciamento de DNA, do Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP). A leitura no sequenciador automático gerou arquivos contendo os

picos de eletroferogramas, que foram analisados com auxílio do programa computacional GeneMarker® v. 1.95 (Softgenetics).

2.1.3 Análise de dados

As análises do conhecimento etnobotânico foram realizadas através de estatística descritiva e técnicas qualitativas (HUBERMAN e MILES 1994; GODOY, 1995), calculando a riqueza (*S*= número de variedades locais cultivadas) e o índice de diversidade de Shannon-Wiener (*H'*) (PIELOU, 1975; ZAR, 2010), adaptado para etnobotânica (BEGOSSI, 1996). Para tais análises foi utilizado o programa PAST version 2.17c (2013) (HAMMER et al., 2001).

A representação gráfica das redes de circulação foi construída com o auxílio do programa Pajek (Program for Large Network Analysis) (BATAGELJ e MRVAR, 2006) utilizando o Layout Kamada-Kawai.

A organização da diversidade genética foi avaliada por meio da análise de coordenadas principais (PCoA) em nível de indivíduo por meio do programa GenAlEx 6.5 (PEAKALL e SMOUSE, 2006). Para o agrupamento pelo método UPGMA utilizou-se do programa Power Marker (LIU e MUSE 2005).

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

A riqueza manejada pela comunidade São Benedito (*S* = 11 variedades locais) está abaixo da encontrada por outros estudos em comunidades tradicionais do Brasil (CHERNELA, 1986 *S*= 137; EMPERAIRE, 2002 *S*= 69; PERONI e HANAZAKI, 2002 *S*= 62; AMOROZO, 2010 *S*=60). Observa-se que a diversidade (*H')* encontrada foi de 2.05, abaixo também do encontrado por Marchetti *et al*. 2013 (*H'*=1.52) em seus estudos com comunidades tradicionais da Baixada Cuiabana. Apesar da baixa diversidade etnobotânica (*H'*=2,05), foi encontradaalta heterozigosidade observada (*Ho* = 0,92) e diversidade gênica (*He* = 0,75). Essa menor diversidade manejada pelos agricultores pode estar diretamente relacionada com a necessidade de cultivo de variedades locais mais rentáveis para a produção de farinha, principal fonte de renda dos agricultores.

Observou-se na Comunidade São Benedito um número médio de de 2,3±1,2 (desvio padrão) variedades por agricultor. Um número reduzido, o que pode ser resultado do grande interesse e procura apenas por conservar variedades mais rentáveis para a produção de farinha. A denominada *Brava* é tida como a mais plantada nas roças. Das 11 variedades identificadas no total, duas variedades possuem aptidão apenas para mandioca de mesa, e nove com dupla função, ou seja, consumo de mesa e produção de farinha, o que indica que os agricultores preferem conservar variedades que atendam as características consideradas necessárias para a produção da farinha. A diminuição da diversidade normalmente é impulsionada por fatores que simplificam o sistema (neste caso,

especialização em variedades para produção de farinha), resultando na gestão de apenas algumas variedades por cultura, geralmente uma (PERONI e HANAZAKI, 2002).

Para compreender a dinâmica de circulação das variedades cultivadas pelos agricultores da comunidade São Benedito, e elucidar as questões mencionadas até o momento, construiu-se a rede de troca de material propagativo que conecta os moradores da comunidade (Figura 1).
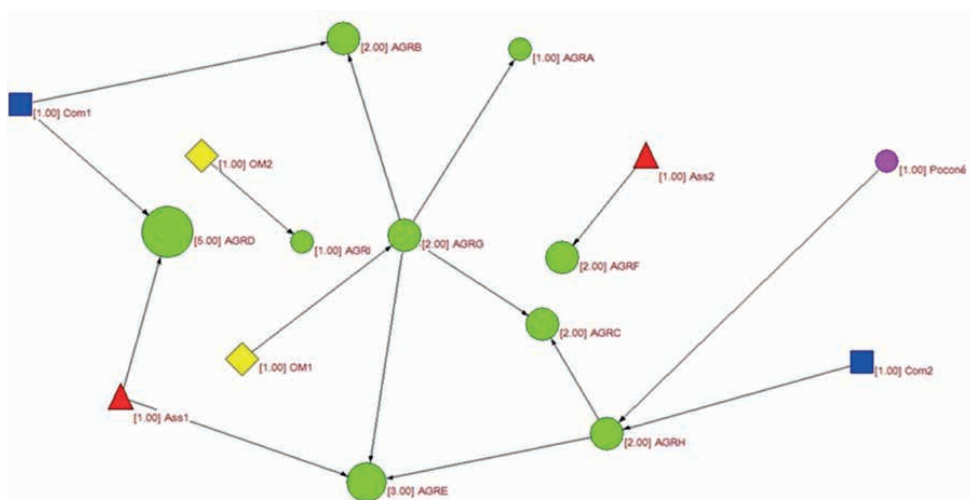
Figura 1. Representação gráfica da rede de circulação de ramas da comunidade estudada. Safra 2015/2016. Layout: Kamada-Kawai. Círculos verdes – AGRA, AGRB, AGRC, AGRD, AGRE, AGRF, AGRG, AGRH, AGRI, AGRJ – Agricultores. Círculo rosa – Cidade de Poconé. Quadrados – Com1 e Com 2 - Comunidades vizinhas. Triângulos – Ass1 e Ass2 – Assentamentos rurais próximos. Losangos – OM1 e OM2 – outros moradores da comunidade não pertencentes ao estudo. A ponta da seta indica o local que recebeu as etnovariedades. O tamanho dos círculos verdes representa o número de etnovariedades que o agricultor cultiva (amplitude 1-5).

Através da análise de rede pode-se observar que a rede de circulação de propágulos e informações ocorre entre os moradores e também com outras comunidades da região, importantes fontes de novas variedades. Dois agricultores (AGRG e AGRH) se destacaram na rede de trocas devido ao maior número de interações (cinco e quatro), respectivamente. Ambos trocam ramas com membros da própria comunidade, e com agricultores das comunidades, podendo ser considerados como elementos-chave na dinâmica da circulação de propágulos. Identificar agentes agricultores mais ativos na rede de circulação de propágulos dentro das comunidades são importantes para programas de melhoramento participativo ou políticas públicas de conservação *on farm* da agrobiodiversidade (MONTESANO *et al.*, 2012).

Na comunidade São Benedito não foram detectadas interações com outros municípios da região, o que pode ser justificado pelo isolamento da comunidade estudada. No entanto, a conexão com as comunidades vizinhas pode representar um elo entre a

comunidade e outras regiões. O agricultor AGRD destaca-se por ser o que maneja maior riqueza (cinco variedades locais), no entanto, não teve grande participação ativa na rede. Tal situação pode ter ocorrido principalmente pela limitação do método utilizado que depende da memória dos agricultores sobre as trocas.

Quanto ao agrupamento das variedades através das análises moleculares pelo método UPGMA, demonstrado na Figura 2, nota-se que as mandiocas foram separadas em dois grupos e a variedade *Baixinha* ficou isolada e mais distante das demais. Segundo o agricultor (AGRD), que a detém, a mesma é proveniente de um Assentamento Rural da região e foi introduzida há apenas cinco anos. O primeiro grupo foi formado pelas variedades *Liberata*, *Brava*, *Cacau* e *Talinho Vermelho* é marcado por estarem sendo cultivadas há mais de dez anos e por unir as variedades mais frequentes. No segundo grupo estão as variedades *Liberatona*, *Broto Roxo*, *Mansa*, *Ramo Branco*, *Carneiro*, *Cuiabana*, introduzidas mais recentemente e menos frequentes entre os agricultores.
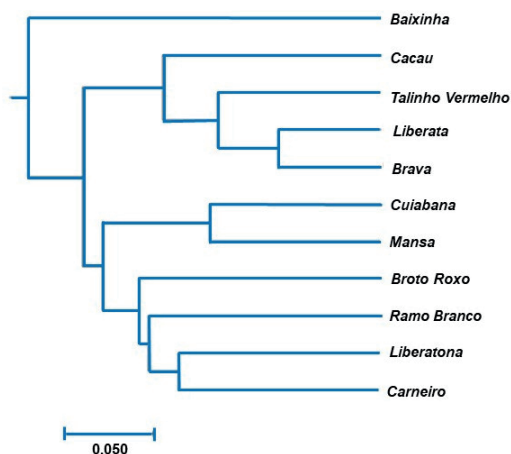
Figura 2. Agrupamento utilizando o método UPGMA para as 11 variedades locais encontradas.

Corroborando à análise do UPGMA, a de componentes principais (PCoA) obteve uma divisão semelhante. Observa-se que a análise indicou que as amostras estão separadas em dois grupos principais e com algumas variedades dispersas, principalmente em função da PCoA 2. Com a primeira coordenada foi possível explicar 23,54% da variação genética, e juntamente o com a segunda coordenada explicam 40,68% da variação total (Figura 3).
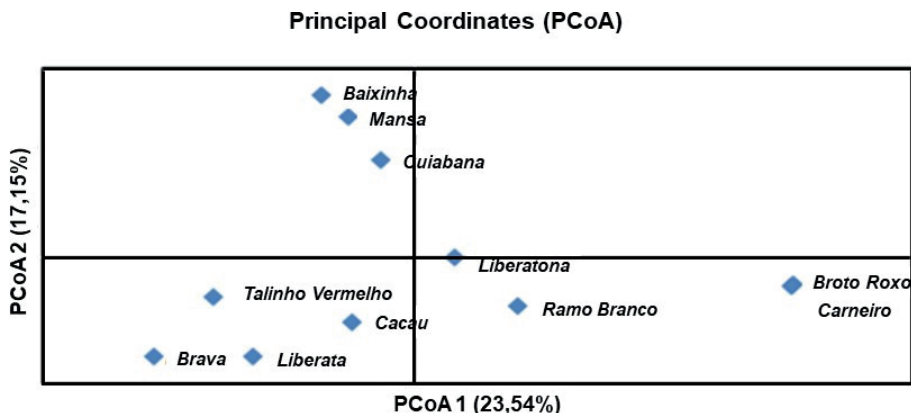
Figura 3. Análise de coordenadas principais (PCoA) realizada com base na variação dos marcadores microssatélites para as variedades cultivadas.

4 I CONCLUSÃO

A baixa riqueza encontrada nas roças (número de variedades cultivadas por agricultor) e na comunidade (total de variedades locais encontradas) pode ser indicativo da necessidade de ações que evidenciem a importância da conservação das variedades locais, mantendo amostras nos próprios quintaisem áreas menores, para que cada unidade familiar funcione como uma pequena reserva de germoplasma.

As variedades possuem uma alta diversidade genética entre si, mas os agricultores da comunidade apresentam baixa diversidade etnobotânica. . Nesse caso é interessante que os agricultores manejem diferentes variedades locais para que possam garantir a continuidade do processo de manutenção e amplificação da diversidade.

REFERÊNCIAS

ALVES-PEREIRA, A.; PERONI, N.; ABREU, A. G.; GRIBEL, R.; CLEMENT, C. R. **Genetic structure of traditional varieties of bitter manioc in three soils in Central Amazonia**. Genetica, v. 139, p. 1259-1271, 2011.

AMOROZO M. C. M. Diversidade agrícola em um cenário de transformação: será que vai ficar alguém para cuidar da roça? In: MING, L. C.; AMOROZO, M. C. M.; KFFURI, C. W. (eds.). **Agrobiodiversidade no Brasil**: experiências e caminhos da pesquisa. Recife: NUPEEA, 2010. p. 378-394.

AMOROZO, M. C. M.; MING, L. C.; SILVA, S. P. **Métodos de coleta e análise de dados em etnobiologia, etnoecologia e disciplinas correlatas**. Rio Claro: UNESP/SBEE/CNPq, 2002.

AMOROZO, M.C.M. **Sistemas agrícolas de pequena escala e a manutenção da agrobiodiversidade: Uma revisão e contribuições**. Botucatu: FCA – UNESP, 2013.

BATAGELJ, V. MRVAR, A. **Pajek-program for large Network analysis**. Connections, v. 21, n. 2, p. 47-57, 1998.

BEGOSSI, A. **Use of ecological methods in ethnobotany**: diversity indices. Economic botany, 50: 280-289, 1996.

CAGNON, J. R.; CEREDA, M. P.; PANTAROTTO, S. Glicosídeos cianogênicos da mandioca: biossíntese, distribuição, detoxificação e métodos de dosagem. *In*: CEREDA, M.P. (ed.) **Agricultura: tuberosas amiláceas Latino Americanas**. São Paulo: Fundação Cargill, 2002. p.83-99.

CARRASCO, N. F.; OLER, J. R. L.; MARCHETTI, F. F.; CARNIELLO, M. A.; AMOROZO, M. C. M.; VALLE, T. L.; VEASEY, E. A. **Growing cassava (Manihot esculenta) in Mato Grosso, Brazil**: genetic diversity conservation in small–scale agriculture. Economic Botany, v. 70, p. 15-28, 2016.

CHAVARRIAGA-AGUIRRE, P. P.; MAYA, M. M.; BONIERBALE, M. W.; KRESOVICH, S.; FREGENE, M. A.; TOHME, J.; KOCHERT, G. **Microsatellites in cassava** (*Manihot esculenta* **Crantz**): discovery, inheritance and variability. Theoretical and Applied Genetics, v. 97, p. 493-501, 1998.

CHERNELA, J. M. Os cultivares de mandioca na área do uaupés (tukâno). *In*: RIBEIRO, B (ed.). **Suma Etnológica Brasileira**. Petrópolis: Etnobiologia, 1986. p. 151-158.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. **Isolation of plant DNA from fresh tissue**. Focus. v. 12, 13-15, 1990.

DUARTE, G. S. D. **Os saberes tradicionais da comunidade são Benedito, Poconé, Mato Grosso**: revelando múltiplos olhares. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais e Ambientais) - Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2016.

ELIAS, M.; MÜHLEN, G. S.; MCKEY, D.; ROA, C.; TOHME, J. **Genetic diversity of traditional South American landraces of cassava** (*Manihot esculenta* **Crantz**): an analysis using microsatellites. Economic Botany, v. 58, n. 2, p. 242-256, 2004.

EMPERAIRE, L. **Agrobiodiversidade em risco** – O exemplo das mandiocas na Amazonia. Ciência Hoje, n. 187, p. 29-33, 2002.

EMPERAIRE, L.; PERONI, N. **Traditional management of agrobiodiversity in Brazil**: A case study of manioc. Human Ecology, v. 35, n. 6, p. 761-768, 2007.

GODOY, A. S. **Introdução à pesquisa qualitativa e suas possibilidades**. Revista de administração de Empresas, v. 35, n. 2, p. 57-63, 1995.

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. **PAST**: Paleontological Statistics Software Package for education and data analysis. Paleontologia Electronica, v. 4, n. 1. p. 1-9, 2001.

HUBERMAN, A. M.; MILES, M. Data management and analysis methods. *In*: Denzin, N. K.; Lincoln, Y. S. **Handbook of qualitative research**. Thousand Oaks: Sage Publications, 1994. p. 428-444.

LIU, K.; MUSE, S. V. **PowerMarker**: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. Bioinformatics. v. 21, n. 9, p. 2128-2129, 2005.

MARCHETTI, F. F.; MASSARO, L. R.; AMOROZO, M. C. D. M.; BUTTURI-GOMES, D. **Maintenance of manioc diversity by traditional farmers in the state of Mato Grosso, Brazil**: a 20-year comparison. Economic botany, v. 67, p. 313-323, 2013.

MBA, R. E. C.; STEPHENSON, P.; EDWARDS, K.; MELZER, S.; NKUMBIRA, J.; GULLBERG, U.; FREGENE, M. **Simple sequence repeat (SSR) markers survey of the cassava** (*Manihot esculenta* **Crantz**) **genome**: towards an SSR based molecular genetic map of cassava. Theoretical and Applied Genetics, v. 102, p. 21-31, 2001.

MONTESANO, V.; NEGRO, D.; SARLI, G.; LOGOZZO, G.; SPAGNOLETTI ZEULI, P. **Landraces in inland areas of the Basilicata region, Italy**: monitoring and perspectives for on farm conservation. Genetic Resources and Crop Evolution, v. 59, p. 701-716, 2012.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. **GENALEX 6:** genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular ecology notes, v. 6, n. 1, p. 288-295, 2006.

PERONI, N.; HANAZAKI, N. **Current and lost diversity of cultivated varieties, especially cassava, under swidden cultivation systems in the Brazilian Atlantic Forest**. Agriculture, Ecosystems & Environment, v. 92, n. 2-3, p. 171-183, 2002.

PIELOU, E. C. **Ecological diversity**. New York: John Wiley, 1975.

SALICK, J.; CELLINESE, N.; KNAPP, S. **Indigenous diversity of cassava:** generation, maintenance, use and loss among the Amuesha, Peruvian Upper Amazon. Economic Botany, v.51, n.1, p. 6-19, 1997.

SCHUELKE, M. **An economic method for the fluorescent labelling of PCR fragments**. Nature biotechnology, v. 18, n. 2, p. 233-234, 2000.

SIQUEIRA, M. V. B. M.; PINHEIRO, T. T.; BORGES, A.; VALLE, T. L.; ZATARIM, M.; VEASEY, E. A. **Microsatellite polymorphisms in cassava landraces from the Cerrado biome, Mato Grosso do Sul, Brazil**. Biochemical Genetics, v. 48, p. 879-895, 2010.

SIQUEIRA, M. V. B. M.; QUEIROZ-SILVA, J. R.; BRESSAN, E. A.; BORGES, A.; PEREIRA, K. J.; PINTO, J. G.; VEASEY, E. A. **Genetic characterization of cassava** (*Manihot esculenta*) **landraces in Brazil assessed with simple sequence repeats**. Genetics and Molecular Biology, v. 32, p. 104-110, 2009.

VIERTLER, R. B. Métodos antropológicos como ferramenta para estudos em etnobiologia e etnoecologia. In: Amorozo, M. C. M.; Ming, L. C.; Silva, S. P. **Métodos de coleta e análise de dados em etnobiologia, etnoecologia e disciplinas correlatas**. *In*: SEMINÁRIO DE ETNOBIOLOGIA E ETNOECOLOGIA DO SUDESTE, 1., 2002, Rio Claro. Anais [...]. Rio Claro: UNESP/CNPq, 2002. p. 12-18.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. New Jersey: Prentice-Hall, 1999.

CAPÍTULO 4

O USO DE MODELOS CELULARES 3D DE ESFEROIDES TUMORAIS COMO UMA PLATAFORMA ALTERNATIVA PRÉ-CLÍNICA ENTRE O CULTIVO DE CÉLULAS EM MONOCAMADAS E O USO DE MODELOS ANIMAIS NA PESQUISA E TRIAGEM DE NOVAS TERAPIAS ANTICÂNCER

Data de submissão: 06/04/2023 *Data de aceite: 02/05/2023*

Jéssica Eduarda dos Santos Batista
Laboratório de Bioquímica Celular, Departamento de Bioquímica/ICBS
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
Porto Alegre – Rio Grande do Sul
http://lattes.cnpq.br/1851661530280527

Valquíria Silva da Silva
Laboratório de Bioquímica Celular, Departamento de Bioquímica/ICBS
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
Porto Alegre – Rio Grande do Sul
http://lattes.cnpq.br/3999606852340811

Fábio Klamt
Laboratório de Bioquímica Celular, Departamento de Bioquímica/ICBS
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
Porto Alegre – Rio Grande do Sul
http://lattes.cnpq.br/3256932358053453

RESUMO: O cultivo celular em laboratório é um marco importante para a ciência porque nos permite estudar o funcionamento das células do nosso corpo, mimetizando em ambiente pré-clínico parâmetros associados à doenças, e servindo de modelo inicial para triagem de novos compostos com potencial terapêutico, em alternativa ao uso de animais. Porém, quando cultivadas em monocamadas (em modelos bidimensionais - 2D), são incapazes de reproduzir totalmente diversas propriedades e características fisiológicas da citoarquitetura teciduais, em especial de tumores sólidos. Por isso, tem-se utilizado métodos de cultivo que representam de forma mais fidedigna as células em ambiente fisiológico, como o cultivo celular tridimensional (3D). Esses cultivos são especialmente úteis para estudar como tumores sólidos respondem a novas drogas anticâncer. Existem diferentes protocolos de cultivo 3D que podem ser utilizados que são úteis para reproduzir a heterogeneidade celular de tumores sólidos e como as células cancerígenas se movimentam e invadem outros tecidos, o que é importante para novos tratamentos aplicados na clínica. Buscamos aqui revisar os principais métodos relacionados com o cultivo de tumores em 3D, salientando seus pontos positivos e suas limitações como plataformas pré-clínicas de pesquisa oncológica e na triagem de novas drogas anticâncer.

PALAVRAS-CHAVE: Esferoides tumorais, modelos de cultivo celular, cultivo

tridimensional.

THE USE OF 3D CELL MODELS OF TUMOR SPHEROIDS AS A PRECLINICAL ALTERNATIVE PLATFORM BETWEEN CULTURE OF MONOLAYERS CELLS AND THE USE OF ANIMAL MODELS IN THE RESEARCH AND SCREENING OF NEW ANTI-CANCER THERAPIES

ABSTRACT: Cell culture in the laboratory is an important milestone for science because it allows us to study the functioning of our body's cells, mimicking disease-associated parameters in a preclinical environment, and serving as an initial model for screening new compounds with therapeutic potential, in alternative to the use of animals. However, when cultivated in monolayers (in two-dimensional models - 2D), they are unable to fully reproduce several properties and physiological characteristics of tissue cytoarchitecture, especially of solid tumors. For this reason, cultivating methods have been used that more accurately represent cells in a physiological environment, such as three-dimensional (3D) cell cultures. These cultures are especially useful for studying how solid tumors respond to new anticancer drugs. There are different 3D culture protocols that can be used that are useful to reproduce the cellular heterogeneity of solid tumors and how cancer cells move and invade other tissues, which is important for new treatments applied in the clinic. We seek here to review the main methods related to the cultivation of tumors in 3D, emphasizing their strengths and limitations as preclinical platforms for oncological research and in the screening of new anticancer drugs.
KEYWORDS: Tumor spheroids, cell culture models, three-dimensional culture.

1 I INTRODUÇÃO

O cultivo celular tem grande importância para o meio científico, pois permite a utilização de células humanas no estudo de processos moleculares, minimizando o uso de animais em pesquisas e em sintomia com a filosofia do 3R (do inglês, *Replacement, Reduction, and Refinement*). Apesar o cultivo celular em monocamada (2D) ser o modelo *in vitro* mais comumente usado devido ao seu fácil manuseio, sua reprodutibilidade, e baixo custo, ele é incapaz de reproduzir totalmente as propriedades dos tumores sólidos. Dado isso, há um grande interesse no desenvolvimento de opções de cultivos celulares que reproduzam de forma mais fidedigna as características encontradas em tumores *in vivo*, por exemplo, para o estudo do comportamento de células tumorais diante de drogas anticâncer (Prestwich, 2008). No início dos anos de 1900, Harrison desenvolveu uma maneira de manter células vivas de anfíbios em seu laboratório. Anos mais tarde, Alexis Carrel baseou-se no trabalho de Harrison para criar um líquido especial que mantinha as células do coração de galinha vivas por mais tempo. Ele percebeu que as células que ficavam mais em contato com esse líquido eram as que sobreviviam melhor e, por isso, começou a cultivá-las em uma superfície de fios de seda para que elas pudessem interagir melhor com o líquido. Isso foi uma das primeiras vezes que as células foram cultivadas em três dimensões (3D). Na década de 40, Johannes Holtfreter desenvolveu uma nova maneira de cultivar células em 3D. Ele usou ágar (um hidrocolóide fortemente gelatinoso

extraído de diversos gêneros e espécies de algas marinhas que consiste em uma mistura heterogênea de dois polissacarídeos, agarose e agaropectina) como base para impedir que as células se aderissem nas placas de cultivo, e desenvolveu um aparelho que fazia a cultura rotacionar. A partir dos anos 50, esse jeito de cultivar células começou a ficar mais popular entre os cientistas e melhorias foram sendo feitas (Amaral *et al*, 2011; Ferreira *et al*., 2018).

Embora o modo de tradicional de cultivo celular em monocamada seja valioso na compreensão de muitos processos biológicos, ele não consegue reproduzir de forma adequada a organização e proliferação celular em tumores. Ainda assim, é a forma mais utilizada de avaliar medicamentos anticâncer em laboratório (Costa *et al*., 2016). No cultivo em monocamada, as células apresentam uma morfologia bidimensional, estabelecendo predominantemente interações entre a célula e o substrato da garrafa ou placa de cultivo. Isso difere significativamente da organização tridimensional presente em tecidos e órgãos humanos, resultando em uma falta de mimetismo com o sistema fisiológico.
Dessa forma, características da biologia celular, como a produção de proteínas de matriz extracelular e de ancoragem, a expressão de genes importantes, a heterogeneidade tecidual, e a atividade metabólica, são pouco representativas do que ocorre *in vivo* (Talukdar *et al*., 2011). Assim, a cultura tridimensional de multicamandas (3D; ou também chamada de esferoides) vêm ganhando espaço como importante ferramenta de pesquisa em pesquisa básica e aplicada (Wenzel *et al*., 2014), e será o foco dessa revisão.

2 | CULTIVO CELULAR TRIDIMENSIONAL

O método conhecido como cultivo de células tridimensional (3D) tem demostrado melhorias nos estudos voltados para a morfologia, monitoramento do número de células, proliferação, resposta a estímulos, diferenciação, metabolismo de fármacos e síntese de proteínas (Antoni *et al*., 2015). A capacidade das culturas em 3D de mimetizar a maneira que as células se comportam num ambiente fisiológico, faz com que esse modelo ganhe mais notoriedade nos mais diversos estudos, como pesquisas oncológicas, de células-tronco, triagem e desenvolvimento de novos medicamentos, entre outros (Ravi *et al*., 2015). A Tabela 1 compara os diferentes aspectos do cultivo de células em 2D e 3D, e explora as vantagens e desvantagens de ambos os métodos. Além disso, o cultivo em 3D agrupo diversos métodos de cultura de células, dependendo do tipo de experimento que está sendo realizado.

Características	Cultivo 2D	Cultivo 3D	Referências
Morfologia das células	A forma das células é pavimentosa e crescem em monocamada na placa.	A forma natural da célula é preservada, e as células crescem em agregados / esferoides 3D, e contêm várias camadas.	Costa *et al.,* 2016; Langhans, 2018
Exposição aos componentes do meio	Todas as células da cultura recebem a mesma quantidade de nutrientes e fatores de crescimento. Isso faz com que mais células sincronizem a fase do ciclo celular.	Os nutrientes não são divididos igualmente entre todas as células. As células do interior permanecem quiescentes, pois recebem menor pressão de oxigênio e nutrientes.	Dhaliwal, 2012; Costa *et al.,* 2016; Langhans, 2018
Junção celular	As junções celulares são menos comuns e representam com menor precisão as interações célula/célula fisiológicas.	As junções celulares são comuns e permitem comunicação entre as células. As células se comunicam por meio de troca de íons, moléculas pequenas e correntes elétricas.	Pontes-Soares *et al.,* 2012; Ravi *et al.,* 2015; Lang *et al.,* 2019
Diferenciação celular	A diferenciação celular é pobre.	As células são bem diferenciadas.	Imamura *et al.,* 2015; Langhans, 2018
Sensibilidade a tratamentos	As células costumam ter pouca resistência a medicamentos, fazendo parecer que drogas administradas às células foram um sucesso de tratamento. As drogas não são bem metabolizadas.	As células geralmente têm mais resistência a drogas tratamento, representando mais precisamente o efeito das drogas.	Haisler *et al.,* 2015; Langhans, 2018
Proliferação celular	As células proliferam em um ritmo anormalmente rápido.	As taxas de proliferação podem ser altas ou baixas, dependendo da técnica e dos tipos de células sendo estudado.	Ravi et al., 2015; Langhans, 2018
Níveis de expressão	Os níveis de expressão de genes e proteínas são frequentemente muito diferentes em comparação com modelos *in vivo*.	Os níveis de expressão de genes e proteínas se assemelham níveis encontrados a partir de células *in vivo*.	Ravi et al.,2015; Costa et al.,2016; Langhans, 2018
Custo	Para estudos em larga escala, é muito mais barato do que usar a cultura 3D.	Tem um custo mais elevado e requerem mais tempo. Reduz as diferenças entre a triagem de drogas *in vitro* e *in vivo*, diminuindo a necessidade de uso de modelos animais.	Costa *et al.,* 2016
Apoptose	Drogas podem facilmente induzir apoptose nas células.	Maior resistência a apoptose induzida por drogas.	Ravi *et al.,*2015; Costa *et al.,*2016; Langhans, 2018
Responder ao estímulo	Representação imprecisa da resposta a estímulos mecânicos.	Representação precisa da resposta a estímulos mecânicos.	Ravi *et al.,*2015; Costa *et al.,*2016
Uso e análise	Altamente replicável e facilmente interpretável. Melhor para culturas de longo prazo.	Pode ser difícil replicar experimentos. Pode ser difícil interpretar os dados.	Kapałczynska *et al.,* 2018

Tabela 1: Diferenças críticas entre os modelos de cultivo em monocamada (2D) e de esferoides (3D)

Diversas técnicas são empregadas para reproduzir modelos celulares tridimensionais em laboratório. Essas técnicas são classificadas em duas categorias: se há ou não um suporte mecânico para as células se desenvolverem e crescerem. Nas técnicas que não utilizam suportes, os esferoides são criados sem o uso de plataformas artificiais para promover o crescimento das células. Em vez disso, as células crescem e se organizam naturalmente em uma estrutura tridimensional (Knight *et al*, 2015). Existem cinco principais técnicas para criar modelos sem suporte: **cultivo em agitação** (Franchi *et al*. 2021; Khot *et al*, 2018; Cartaxo *et al*, 2020), **gota suspensa** (do inglês, *hanging drop*) (Djomehri *et al*., 2018; Amaral *et al*, 2017), **sobreposição líquida** (Costa *et al*, 2018; Muniandy *et al*, 2021), **levitação magnética** (Haisler *et al*., 2013; Hoarau-Véchot *et al*., 2018) e **técnicas microfluídicas** (Figura 1).
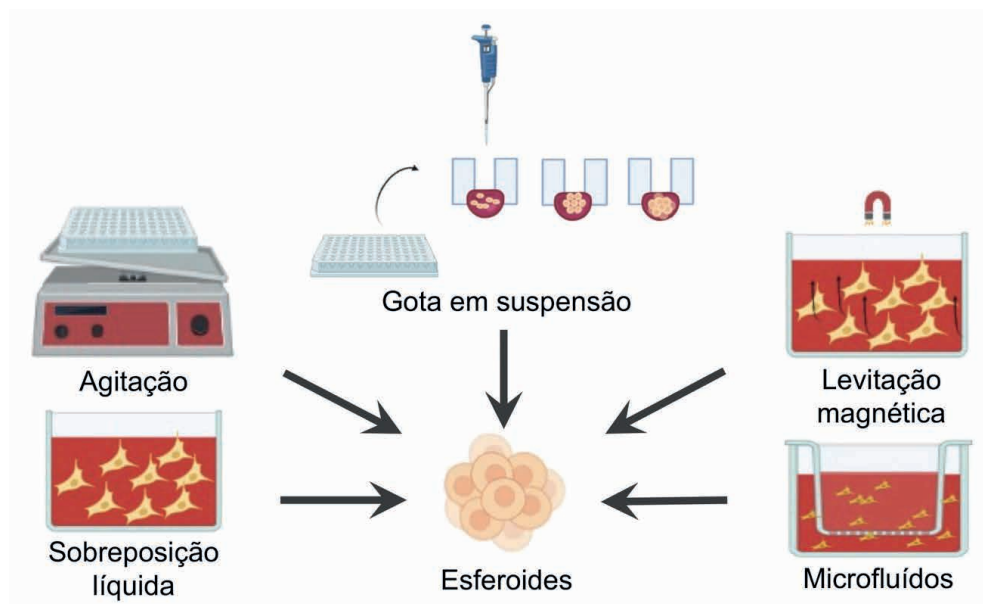
Figura 1. Técnicas para geração de modelo de câncer 3D *in vitro* sem uso de suportes.

Já nas técnicas que se baseiam em modelos com suporte, os esferoides são criados em estruturas artificiais feitas de polímeros ou outros materiais que reproduzem as condições da matriz extracelular (ECM). Estas técnicas tendem a ter um custo mais elevado dependendo do material escolhido, oferecendo suporte para o crescimento celular e permitindo que as células cresçam em condições semelhantes às dos tumores *in vivo*. Existem vários tipos de suportes, incluindo **hidrogéis**, por exemplo *Matrigel* (Flores-Torres *et al*., 2021; Hongisto et al., 2013), **suportes descelularizados** (Koh et al., 2018), **fibrosos** (Girard et al., 2013; Rabie et al., 2022), **microesferas** (Dhamecha et al., 2020; Pradhan et al., 2017) e suportes **bioimpressos** em 3D (Wu et al., 2016) (Figura 2) A escolha do tipo

de suporte vai depender da *expertise* do grupo de pesquisa em determinada técnica de produção desejadas.
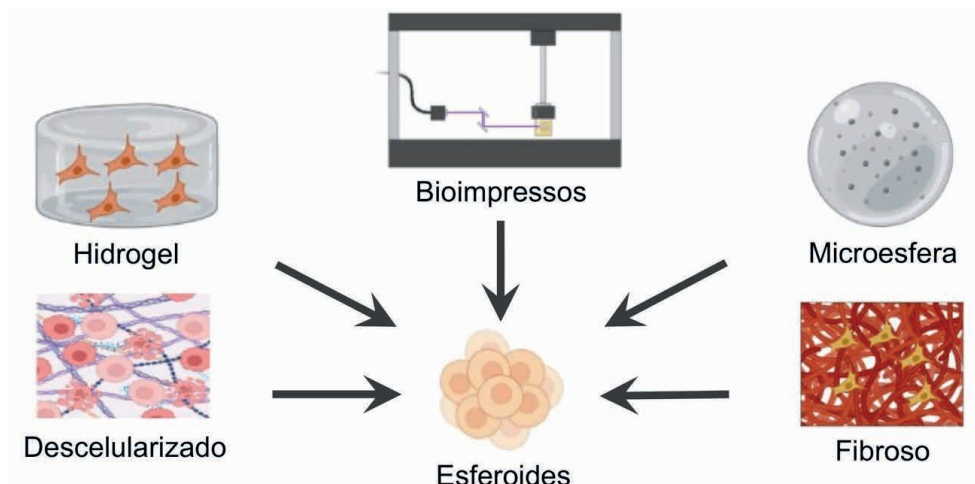
Figura 2. Técnicas para geração de modelo de câncer 3D *in vitro* com uso de suportes.

3 | CÂNCER E CULTIVO TRIDIMENSIONAL

O cultivo celular em 3D é amplamente utilizado para estudar diferentes tipos de câncer *in vitro*, por exemplo, mama (Costa *et al*., 2014), cervical (Costa *et al*., 2014), cólon (Ludwig *et al*., 2013), pulmão (Amann *et al*., 2014), pâncreas (Dufau *et al*., 2012; Shankar *et al*., 2011) e próstata (Takagi *et al*., 2007; Wartenberg *et al*., 2005a, 2005b), e suas vantagens em relação ao cultivo celular em monocamadas (2D) serão exploradas a seguir.

3.1 Heterogeneidade celular e sinalização célula-célula

O conceito atual da heterogeneidade do tumor é baseado nos princípios básicos evolutivos propostos por Darwin, sendo a essência do crescimento e desenvolvimento neoplásico. Esse princípio afirma que uma única célula somática possui característica hereditária para a proliferação com mutação, que confere uma vantagem adaptativa de sobrevivência sobre aquelas células sem essa característica (Kleppe & Levine, 2014; Almendro *et al*, 2013).

Esferoides tumorais podem ser compostos apenas por células do câncer (chamados de esferoides homotípicos) ou por células do câncer cultivadas junto com outros tipos de células (chamados de esferoides heterotípicos) para criar um microambiente tumoral mais parecido ao do corpo humano, essa combinação de diferentes células auxilia no entendimento de como o câncer interage com o seu ambiente e como pode afetar outros tecidos. É comum cultivar esferoides tumorais com fibroblastos (Costa *et al*., 2014), células endoteliais (Sampaio *et al*., 2012) ou células imunes (Rodríguez *et al*., 2012).

Os esferoides heterotípicos têm diferentes proporções de células de câncer para células estromais (células de tecido conjuntivo, como os fibroblastos, células do sistema imunológico, os pericitos, as células endoteliais e as células inflamatórias) para melhor mimetizar a heterogeneidade celular e o microambiente encontrados em tumores sólidos (Costa *et al*., 2014). Nos esferoides, as células crescem em contato mútuo, dessa maneira reproduzindo a citoarquitetura, as comunicações celulares e as vias de sinalização observadas em tumores sólidos (Hanahan e Coussens, 2012). Essa comunicação é vital para o estabelecimento de um ambiente resistente a tratamentos quiomioterápicos, como observado *in vivo* (McMillin *et al*., 2013)

3.2 Estrutura interna dos esferoides

Em comparação aos tumores sólidos, os esferoides multicelulares apresentam semelhança com a heterogeneidade celular, morfologia e características funcionais, mimetizando microrregiões de tumores avasculares, regiões de tumores entre capilares, e micrometástases (McIntyre *et a*l., 2012; Valley *et al*., 2014). As células dos esferoides são expostas a um fornecimento de oxigênio e nutrientes de forma heterogênea, onde as células na periferia são compostas por células com altas taxas de proliferação, e remonta a situação de células tumorais próximas a vasos sanguíneos, que estão em plena atividade (Trédan et al., 2007). Já as células localizadas mais no interior são quiescentes e acabam morrendo por apoptose ou necrose devido à ausência de oxigênio (hipóxia) e nutrientes (Minchinton e Tannock, 2006; Trédan et al., 2007; Mehta et al., 2012) (Figura 3).
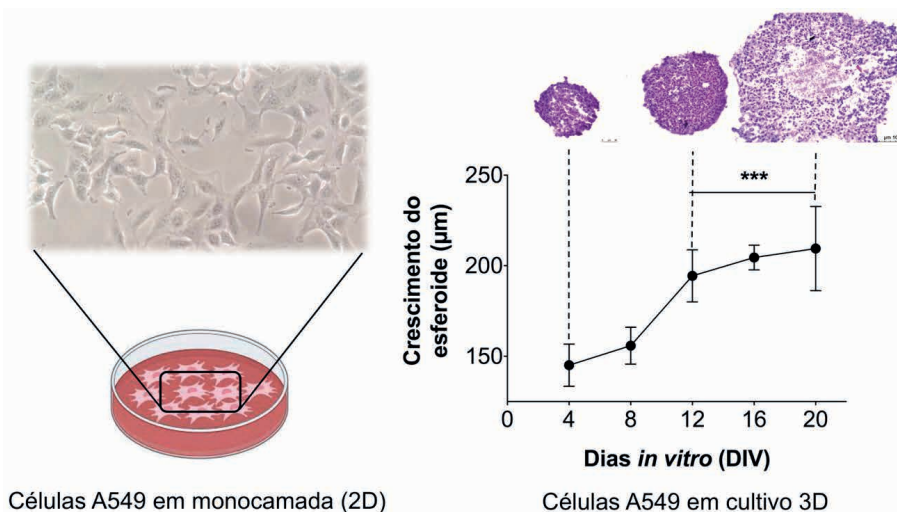
Figura 3. Células de adenocarcinoma humano A549 em cultivo de monocamada (2D) e em esferoide (3D). Esquerda: Micrografia da linhagem em crescimento exponencial demonstrando sua morfologia pavimentosa, aderida ao fundo da placa. Direita: Curva de crescimento dos esferoides cultivados por diferentes dias *in vitro* (DIV). Acima: cortes histológicos de esferoides de 4, 12 e 20 dias de cultivo, corados com hematoxilina/eosina, demonstrando o crescimento em volume, diferentes densidades celulares, e a formação de um interior quiescente/necrótico aos 20 DIV.

Além disso, em ambientes hipóxicos (com baixa disponibilidade e/ou concentração de oxigênio), as células convertem o piruvato glicolítico em lactato para obter energia, através de um processo de reprogramação metabólica conhecido como efeito Warburg. O acúmulo de lactato nos esferoides é um dos responsáveis pela acidificação do seu microambiente (levando a uma queda do pH de 6,5 - 7,2), o que também ocorre em tumores sólidos *in vivo* (Koppenol *et al.*, 2011; Trédan *et al.*, 2007). Os quimioterápicos citotóxicos que promovem a morte celular através da formação de espécies reativas de oxigênio, como a doxorrubicina (Kovacic e Osuna, 2000; Wartenberg *et al.*, 2005a, 2005b) e cisplatina (Deavall *et al.*, 2012), têm menor eficácia terapêutica nas regiões mais internas dos esferoides, devido a formação de hipóxia e a baixa taxa proliferativa (Trédan et al., 2007). Assim, drogas que possuem ação eficaz em células que se dividem rapidamente, por exemplo, o paclitaxel (Mitchison, 2012) têm pouco efeito terapêutico nas regiões interiores dos esferoides, pois são constituídos por células quiescentes/senescentes e necróticas (Minchinton e Tannock, 2006; Trédan *et al.*, 2007).

O desenvolvimento de diferentes técnicas para uso do modelo celular tridimensional permitiu o estudo de características dos esferoides tumorais, como a morfologia (Desmaison *et al.*, 2013; Kang et al., 2015), o tamanho (Evensen *et al.*, 2013), a organização celular em camadas (Amann *et al.*, 2014), as proteínas e expressão gênica (Chen *et al.*, 2014; Härmä *et al.*, 2014), padrões do ciclo celular (Khaitan *et al.*, 2006; Laurent *et al.*, 2013; Lorenzo *et al.*, 2011) e o potencial invasivo e metastático das células cancerígenas. Além disso, essas técnicas são extremamente importantes para o entendimento dos tumores e para caracterizar o efeito de novas terapêuticas anticancerígena em esferoides multicelulares (Carver *et al.*, 2014; Goodman *et al.*, 2008; Desmaison *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2012), apoiando assim a translação pré-clínica para clínica, que permanece ainda baseada principalmente em experimentação animal.

4 I CONCLUSÃO

É de extrema importância a busca por modelos alternativos ao uso de animais em laboratório que possam produzir resultados confiáveis e previsíveis, semelhantes aos obtidos em ensaios clínicos. A implementação de cultivos celulares em 3D pode ser um indicativo da academia à preocupação crescente das sociedades científicas em relação ao uso indiscriminado de animais de laboratório como modelos experimentais, em sintonia a política dos 3Rs (*Substituição, Redução e Refinamento*). Dentre as diversas formas de obtenção de esferoides, o modelo adequado deve ser escolhido levando-se em consideração o objetivo do estudo, as condições experimentais do grupo de pesquisa e suas *expertises*.

Apesar da técnica de cultivo tridimensional ser uma excelente alternativa, existem desafios para sua validação como substitutos aos ensaios clássicos com uso de animais

de laboratório. A confiabilidade dos resultados é primordial e depende da reprodutibilidade adequada de protocolos, da padronização de métodos de cultivo, das boas práticas em métodos *in vitro*, da automação dos métodos de análise e da avaliação de vias de efeitos adversos. Embora represente diversos desafios, o cultivo 3D de células representa um avanço em direção a modelos mais próximos da fisiologia dos tecidos sendo assim, são candidatos promissores como alternativas ao uso de animais em na pesquisa científica.

REFERÊNCIAS

Amaral, R.L.F.; Miranda, M.; Marcato, P.D.; Swiech, K. (2017) **Comparative Analysis of 3D Bladder Tumor Spheroids Obtained by Forced Floating and Hanging Drop Methods for Drug Screening**. Front. Physiol, 8, 605

Amaral, J. B. do; Machado-Santelli, G. M. (2011) **A cultura de células em 3 dimensões e a sua aplicação em estudos relacionados a formação do lúmen**. Naturalia, v. 34, p. 1–20.

Antoni, D., Burckel, H., Josset, E., and Noel, G. (2015). **Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo.** Int. J. Mol. Sci. 16, 5517–5527. doi: 10.3390/ ijms16035517

Cartaxo, A.L.; Estrada, M.F.; Domenici, G.; Roque, R.; Silva, F.; Gualda, E.J.; Loza-Alvarez, P.; Sflomos, G.; Brisken, C.; Alves, P.M.; et al (2020). **A novel culture method that sustains ERα signaling in human breast cancer tissue microstructures**. J. Exp. Clin. Cancer Res., 39, 161

Costa, E.C.; de Melo-Diogo, D.; Moreira, A.F.; Carvalho, M.P.; Correia, I.J (2018). **Spheroids Formation on Non-Adhesive Surfaces by Liquid Overlay Technique: Considerations and Practical Approaches**. Biotechnol. J., 13, 1700417.

Costa, E. C., Moreira, A. F., de Melo-Diogo, D., Gaspar, V. M., Carvalho, M. P., and Correia, I. J. (2016). **3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. Biotechnol**. Adv. 1427–1441. doi: 10.1016/j. biotechadv.2016.11.002

Djomehri, S.I.; Burman, B.; Gonzalez, M.E.; Takayama, S.; Kleer, C.G. (2018) **A reproducible scaffold-free 3D organoid model to study neoplastic progression in breast cancer.** J. Cell Commun. Signal, 13, 129–143.

Ferreira, L. P., Gaspar, V. M., and Mano, J. F. (2018). **Design of spherically structured 3D in vitro tumor models-advances and prospects**. Acta Biomater. 75, 11–34. doi: 10.1016/j.actbio.2018.05.034

Franchi-Mendes, T.; Eduardo, R.; Domenici, G.; Brito, C. (2021). **3D Cancer Models: Depicting Cellular Crosstalk within the Tumour Microenvironment**. Cancers, 13, 4610.

Knight, E.; Przyborski, S. (2015) **Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro**. J. Anat., 227, 746–756

Khot, M.I.; Perry, S.L.; Maisey, T.; Armstrong, G.; Andrew, H.; Hughes, T.A.; Kapur, N.; Jayne, D.G.(2018) **Inhibiting ABCG2 could potentially enhance the efficacy of hypericin-mediated photodynamic therapy in spheroidal cell models of colorectal cancer. Photodiagn**. Photodyn. Ther. 23, 221–229.

Prestwich GD. (2008) **Evaluating drug efficacy and toxicology in three dimensions: using synthetic extracellular matrices in drug discovery. Accounts of chemical research**. 41: 139–148

Ravi, M., Paramesh, V., Kaviya, S. R., Anuradha, E., and Solomon, F. P. (2015). **3D cell culture systems: advantages and applications. J. Cell. Physiol**. 230, 16–26. doi: 10.1002/jcp.24683

Stelzer E, Parczyk K, Prechtl S e Steigemann P. (2014) **3D high-content screening for the identification of compounds that target cells in dormant tumor spheroid regions.** Experimental cell research. 323: 131–143

Talukdar S, Mandal M, Hutmacher DW, Russell PJ, Soekmadji C, Kundu SC. (2011) **Engineered silk fibroin protein 3D matrices for in vitro tumor model. Biomaterials**. 32: 2149– 2159

Foglietta, F.; Canaparo, R.; Muccioli, G.; Terreno, E.; Serpe, L. (2020) **Methodological aspects and pharmacological applications of three-dimensional cancer cell cultures and organoids**. Life Sci., 254, 117784.

Haisler, W.L.; Timm, D.M.; Gage, J.A.; Tseng, H.; Killian, T.; Souza, G.R (2013). **Three-dimensional cell culturing by magnetic levitation**. Nat. Protoc., 8, 1940–1949.

Hoarau-Véchot, J.; Rafii, A.; Touboul, C.; Pasquier, J.(2018) **Halfway between 2D and Animal Models: Are 3D Cultures the Ideal Tool to Study Cancer-Microenvironment Interactions?** Int. J. Mol. Sci, 19, 181.

Lu, Z.; Rajan, S.A.P.; Song, Q.; Zhao, Y.; Wan, M.; Aleman, J.; Skardal, A.; Bishop, C.; Atala, A.; Lu, B(2021). **3D scaffold-free microlivers with drug metabolic function generated by lineage-reprogrammed hepatocytes from human fibroblasts.** Biomaterials, 269, 120668.

Muniandy, K.; Ahmad, Z.A.; Dass, S.A.; Shamsuddin, S.; Kumaran, N.M.; Balakrishnan, V. (2021) **Growth and Invasion of 3D Spheroid Tumor of HeLa and CasKi Cervical Cancer Cells**. Oncologie, 23, 279–291.

Moshksayan, K.; Kashaninejad, N.; Warkiani, M.E.; Lock, J.G.; Moghadas, H.; Firoozabadi, B.; Saidi, M.S.; Nguyen, N.-T.(2018) **Spheroids-on-a-chip: Recent advances and design considerations in microfluidic platforms for spheroid formation and culture.** Sens. Actuators B Chem., 263, 151–176.

Wenzel C, Riefke B, Gründemann S, Krebs A, Christian S, Prinz F, Osterland M, Golfier S, Räse S, Ansari N, Esner M, Bickle M, Pampaloni F, Mattheyer C, Stelzer E, Parczyk K, Prechtl S e Steigemann P. (2014) **3D high-content screening for the identification of compounds that target cells in dormant tumor spheroid regions**. Experimental cell research. 323: 131–143.

CAPÍTULO 5

EFECTO DE CAMPOS ELECTROMAGNÉTICOS PULSANTES DE 120 HERTZ Y CAMPOS MAGNÉTICOS ESTÁTICOS, SOBRE PARÁMETROS SANGUÍNEOS ENZIMÁTICOS DE RATAS (*Rattus norvegicus*) LÍNEA SPRAGUE DAWLEY

Data de aceite: 02/05/2023

Abraham O. Rodríguez-De la Fuente
Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Ciencias Exactas y Desarrollo Humano
San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.
https://orcid.org/0000-0001-5665-7819

José Antonio Heredia-Rojas
Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Ciencias Exactas y Desarrollo Humano
San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.
https://orcid.org/0000-0001-7453-8573

Eduardo Alfonso Rebollar-Téllez
Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Ciencias Exactas y Desarrollo Humano
San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.
https://orcid.org/0000-0002-8173-3550

Pedro Antonio Noguera-Díaz-López
Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Ciencias Exactas y Desarrollo Humano
San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.
https://orcid.org/0000-0003-4506-2806

Pedro César Cantú-Martínez
Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Ciencias Exactas y Desarrollo Humano
San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.
https://orcid.org/0000-0001-8924-5343

Omar Heredia-Rodríguez
Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Ciencias Exactas y Desarrollo Humano
San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.
http://www.fcb.uanl.mx/nw/es/2012-03-05-22-25-25/profesores-en-el-sni/details/39/998-omar-heredia-rodriguez

RESUMEN: En los últimos años se ha incrementado el número de investigaciones para evaluar los efectos de los campos electromagnéticos (CEM) y los campos magnéticos estáticos (CME) en sistemas biológicos. Las técnicas usadas en estos estudios incluyen, entre otras; parámetros hematológicos y parámetros bioquímicos enzimáticos. El objetivo del presente estudio, fue evaluar el efecto de una exposición a CEM de tipo pulsante y CME generados por una máquina de uso terapéutico en seres humanos, en los niveles de enzimas de importancia fisiológica, usando un modelo murino. Se seleccionaron para este propósito ratas Sprague-Dawley de ambos sexos que fueron expuestas en dos modalidades de exposición: Exposición aguda y subaguda. La exposición aguda constó de 3 días con dos sesiones diarias de 50 minutos con intervalo de una hora entre ellas. Por su parte, la exposición subaguda, consistió en un tiempo de 2 semanas, dos sesiones por día de 50 minutos cada una con intervalo de una hora entre las sesiones, con excepción de un día de descanso. Al término de los tratamientos, se tomaron muestras de sangre arterial para la determinación de enzimas sanguíneas: Fosfatasa alcalina (FA), Transaminasa Glutámico Oxaloacética (TGO) y Transaminasa Glutámico Pirúvica (TGP).
Los resultados mostraron que, al comparar los niveles de las enzimas FA y TGP de animales expuestos al tratamiento magnético producido por la máquina con el grupo control no expuesto, no se encontraron diferencias ($p > 0.05$). Por su parte, los niveles enzimáticos de TGO mostraron un ligero, pero significativo incremento, solo en machos expuestos a los campos magnéticos generados por la máquina en una fase aguda de tratamiento ($p < 0.05$). En lo concerniente a la fase de exposición subaguda, por el contrario, fue en las hembras expuestas a los campos magnéticos, las que presentaron niveles de TGO elevados con respecto al grupo control no expuesto ($p < 0.05$). En conclusión, se puede asumir que una exposición aguda y subaguda a CEM pulsantes de 120 Hz y CME producidos por una máquina de uso terapéutico, no generaron efectos significativos en los niveles enzimáticos de FA y TGP de ratas de ambos sexos, y aunque se observó un incremento en los niveles de TGO, éstos no fueron lo suficientemente elevados para suponer un proceso patológico generado por la exposición a los campos magnéticos probados en el presente estudio.
PALABRAS CLAVE: Campos magnéticos pulsantes, enzimas, *Rattus norvegicus*, sangre.

EFFECT OF 120 HERTZ PULSED-ELECTROMAGNETIC FIELDS AND STATIC MAGNETIC FIELDS ON ENZYMATIC BLOOD PARAMETERS OF RATS (*Rattus norvegicus*) SPRAGUE DAWLEY LINE.

ABSTRACT: In recent years, the number of investigations to evaluate the effects of electromagnetic fields (EMF) and static magnetic fields (SMF) on biological systems has increased. The techniques used in these studies include, among others; hematological and enzymatic biochemical parameters. The aim of the current study was to evaluate the effect of an exposure to pulsed EMF and SMF generated by a therapeutical machine used in humans, on the levels of enzymes of physiological importance using a murine model. Sprague-Dawley rats of both sexes were selected and exposed to magnetic fields in two exposure regimens: Acute and subacute exposure. The acute exposure consisted of 3 days with two daily sessions of 50 minutes with an interval of one hour between them. On the other hand, the subacute exposure consisted of an exposure time of 2 weeks, two sessions per day of 50 minutes each with an interval of one hour between sessions, with the exception of one day off. At the end

of the treatments, arterial blood samples were taken for evaluating blood enzymes: Alkaline phosphatase (ALP), Glutamic Oxaloacetic Transaminase (GOT) and Glutamic Pyruvic Transaminase (GPT). The observed results showed that, when comparing the levels of ALP and GPT enzymes from animals exposed to magnetic treatment produced by machine with control group not exposed, no differences were found ($p > 0.05$). On the other hand, enzymatic levels of GOT showed a slight but significant increase in males exposed to magnetic fields generated by the machine in the acute treatment regimen ($p < 0.05$). Regarding subacute exposure regimen, the female animals exposed to magnetic fields were who presented elevated GOT levels compared to control group not exposed ($p < 0.05$). In conclusion, it can be assumed that an acute and subacute exposure to pulsed EMF of 120 Hz and SMF produced by a therapeutic machine did not generate significant effects on the enzymatic levels of ALP and GPT of rats of both sexes, and although an increase in GOT levels was observed, these were not high enough to suppose a pathological process generated by exposure to magnetic fields tested in the current study.
KEYWORDS: Pulsating magnetic fields, enzyme, *Rattus norvegicus*, blood.

1 I INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se han llevado a cabo un gran número de investigaciones concernientes a los efectos de los campos electromagnéticos (CEM) en sistemas biológicos, sin embargo, no se ha llegado a un consenso general sobre estos efectos. Aun así, se ha observado que estas radiaciones no ionizantes sí son capaces de producir diversos efectos medibles en seres vivos.

La radiación no ionizante normalmente interactúa con el tejido mediante la generación de calor, sin embargo, las que aquí nos ocupan no tienen un efecto térmico, y su efecto tiene más que ver con la inducción de estrés oxidativo dentro de las células (Sies,1986). Sin embargo, aún quedan muchas incertidumbres acerca de la severidad de los efectos de la exposición tanto aguda como crónica a este tipo de radiaciones, sobre todo aquellas que son de frecuencia muy baja o extremadamente baja, como las probadas en este estudio. Generalmente, el público está más preocupado por los riesgos de los CEM generados por líneas de alta tensión, las ondas de radio y las microondas (Ng, 2003).

En contraparte, se ha observado que existen efectos benéficos de los CEM que son de interés para el ser humano (Basset, 1993). Es por esto, que, en el presente estudio, se evaluó la inocuidad de un sistema que combina la exposición a CEM de tipo pulsante con campos magnéticos estáticos (CME), patentado para tratamiento de cáncer en seres humanos (US Patent # 6235251 B1) (Davidson, 2001) usando un modelo murino con ratas (*Rattus norvegicus*) de la línea Sprague Dawley con la intención de observar si esta máquina produce algún tipo de efecto nocivo sobre los parámetros enzimáticos sanguíneos de estos animales. Al respecto, se ha encontrado que la exposición a CEM de frecuencia extremadamente baja causa un incremento en las enzimas alanina aminotransferasa (ALT), lactato deshidrogenasa (LDH), además de aspartato aminotransferasa (AAT), (Sánchez-

González, et al., 2007).

En un trabajo realizado por Sallam y Awad (2008), se evaluó el efecto de un CME de 10, 14, 18 y 22 mT sobre la función de enzimas hepáticas en ratas. Los animales fueron expuestos por una hora diaria durante una semana, y se midieron las enzimas; transaminasa glutámico oxaloacética (TGO) y la, transaminasa glutámico pirúvica (TGP) después de la exposición a los CME. Los resultados mostraron incrementos en los niveles de ambas enzimas de hasta tres veces en los animales expuestos a los CME en comparación con el grupo control no expuesto. Sin embargo, estas elevaciones se recuperaron luego de una semana después de haber cesado la exposición, pero no volvieron a sus valores originales de antes de la exposición.

En otro estudio, se evaluó el efecto de CEM producidos por telefonía celular sobre las enzimas ALT y AAT de ratas albinas. Los animales fueron colocados en jaulas de polipropileno y expuestos a la radiación de la telefonía a tasa de absorción específica (1.25 vatios/kg) durante un período de 2 meses. Los resultados indicaron que ambas enzimas aumentaron significativamente en las ratas expuestas, en comparación con sus controles (Kaur y Khera, 2018).

En otro estudio, llevado a cabo en seres humanos, se determinó también la actividad de la ALT y AAT *in vitro* en campo geomagnético normal y en ausencia de campo magnético o campo magnético cero (ZMF) durante 72 horas. Se encontró una disminución del 24–31% de las actividades de las enzimas en condiciones de ZMF en comparación con los controles en el campo geomagnético normal de la zona de estudio (Ciorba et al., 2001).

Por su parte, Ibrahim (2018), evaluó el efecto de la exposición a un CEM de intensidad 217 Gauss sobre la actividad enzimática del hígado de ratones machos. La función hepática se estudió mediante análisis de las enzimas ALT y AAT. Los resultados mostraron que la exposición al CEM produjo una disminución significativa en la concentración de la enzima ALT en comparación con el grupo control, mientras que no hubo efecto en los niveles de AAT en comparación con el control.

En un estudio reciente (Guo et al., 2020) se encontró, que, al exponer ratones a pulsos electromagnéticos de banda ancha, los animales mostraron aumentos significativos en los niveles de ALT y AAT.

En vista de los resultados controversiales reportados en la literatura, el presente estudio fue diseñado con el propósito de evaluar el efecto de una exposición aguda y subaguda a CEM pulsantes de 120 Hertz de frecuencia y CME generados por una máquina de uso terapéutico, sobre parámetros enzimáticos sanguíneos que incluyen los niveles de fosfatasa alcalina (FA), transaminasa glutámico oxaloacética (TGO) y transaminasa glutámico pirúvica (TGP) de ratas (*Rattus norvegicus*) de la línea Sprague-Dawley.

2 | MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron un total de 60 ratas, 30 machos y 30 hembras de la línea Sprague Dawley de 16 semanas de edad con pesos de: 250-300 g para el caso de las hembras y de 400-450 g para los machos. Los animales fueron proporcionados y acondicionados en el bioterio del Centro de Investigación Biomédica del noreste, del Instituto Mexicano del Seguro Social, México.

Condiciones de Bioterio

La temperatura se mantuvo entre 18 y 25 °C. La ventilación de la habitación se realizó con 15 a 18 recambios de aire total por hora. El ruido ambiental no fue mayor a 85 dB y el fotoperíodo fue de 12 h luz/12 h oscuridad. La humedad relativa se mantuvo entre 40 y 70%. Se suministró una dieta estándar de roedores (Purina, Inc.) *ad libitum*. Estas condiciones son de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) sobre especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.

Diseño de los Bioensayos

Fase aguda de exposición a CEM pulsantes y CME

En esta fase se utilizaron 30 ratas, 15 hembras y 15 machos que fueron subdivididas en los siguientes grupos: **(*a*)** animales expuestos a CEM pulsantes de 120 Hz + CME, durante 3 días consecutivos en 2 sesiones diarias de 50 minutos de exposición cada una, con intervalos de 1 hora entre ellas. **(*b*)** animales expuestos a un CME, en este caso la máquina no recibió corriente eléctrica y solo se consideró la influencia de los magnetos de neodimio que el diseño del aparato contempla. La exposición fue también durante 3 días consecutivos, el mismo número de sesiones y tiempos que en el grupo anterior, **(*c*)** conformado por animales no expuestos a la acción de la máquina, y que fueron manejados en su totalidad en las condiciones de bioterio antes mencionadas. Cada uno de los grupos incluyó 5 hembras y 5 machos. Los 30 animales de esta fase, fueron anestesiados al momento de completar su ciclo de exposición, para obtener muestras de sangre total que fue procesada como se explica más adelante.

Fase subaguda de exposición a CEM pulsantes y CME

En esta fase también se utilizaron 30 ratas; 15 hembras y 15 machos que se subdividieron en los siguientes grupos: **(*d*)** animales expuestos a CEM pulsantes de 120 Hz + CME, durante 50 minutos, 2 veces al día, con intervalo de 1 hora entre las exposiciones, durante dos semanas con suspensión (descanso) del séptimo día, **(*e*)** exposición a CME (máquina apagada, es decir sin recibir corriente eléctrica en la bobina), durante 50 minutos, 2 veces al día con intervalos de 1 hora entre las exposiciones, durante 2 semanas y con

suspensión del séptimo día, y ***(f)*** grupo no expuesto a la máquina, manejados por el mismo periodo de tiempo como el de los otros grupos de esta fase, en las condiciones de bioterio antes mencionadas. Cada grupo incluyó 5 hembras y 5 machos. Los 30 animales de esta fase fueron también anestesiados al momento de completar su ciclo de tratamiento y así se obtuvo sangre total para las diversas determinaciones enzimáticas.

Características del sistema de exposición a CEM pulsantes + CME

De acuerdo a la patente # US 6235251 B (Davidson, 2001), el sistema fue originalmente diseñado para magnetoterapia en seres humanos. El dispositivo está formado por un conjunto de imanes permanentes de neodimio que en conjunto constituyen un anillo. Incluye también una bobina conformada con alambre de cobre laqueado alrededor de este anillo de imanes. Una vez que pasa corriente eléctrica por la bobina, se genera un CEM combinado con el CME de los imanes. La frecuencia del componente de corriente alterna es programable y se establece en 120 Hertz, que es la estipulada por el diseñador para los esquemas de terapia. Mediante un teslámetro marca Bell FW 6010. No. de serie 9916002 (Orlando Fl, USA) y sonda de efecto Hall, se determinó la densidad de flujo magnético para el CEM pulsante combinado con el CME, y que resultó ser en promedio de 17.6 mT en la zona en que se expusieron los animales. Por su parte, el CME fue en promedio de 8.6 mT, que se midió con el mismo instrumento mencionado anteriormente, pero en la función de campo estático. Adicionalmente, se acopló al sistema de exposición un osciloscopio digital Marca Fluke Modelo 96B-Scopemeter Series II de 60 MHz, No. de serie DM 6880257 (Bell Instruments, Orlando Fl, USA), y se detectó una onda de tipo pulsante de 120 Hertz de frecuencia. Adicionalmente, la homogeneidad del CEM y del CME fue constatada en la zona de exposición de los especímenes. Los animales fueron colocados en la zona de exposición en jaulas de acrílico transparente.

Determinación de enzimas sanguíneas

Finalizados los ciclos de tratamiento magnético de los diferentes grupos, se procedió a la obtención de la muestra sanguínea. Los animales fueron anestesiados por vía intraperitoneal con una solución de 6.3 g/100 ml de pentobarbital sódico de uso veterinario (Cheminova-Nutrifasa®), a una dosis de 3 a 5 mg/100 g de peso corporal. La sangre se extrajo mediante punción aórtica con aguja calibre No.21 y jeringa de 10 ml y fueron vertidos 7 ml de sangre en un tubo de13 x 100 mm, sin anticoagulante. Una vez separado el suero por centrifugación, las muestras fueron procesadas en un equipo automatizado Roche Hitachi 911. Las 60 muestras analizadas incluyeron la determinación de las siguientes enzimas: Fosfatasa alcalina (FA), Transaminasa Glutámico Oxaloacética (TGO) y Transaminasa Glutámico Pirúvica (TGP).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se sometieron a la prueba de Kolmogorov-Smirnov para comprobar si presentaban distribución normal. Posteriormente, se realizó una prueba de análisis de varianza de un factor y la prueba de comparación de medias de Tukey, para establecer diferencias individuales entre los grupos de estudio. Todos los análisis se elaboraron con el paquete estadístico SPSS versión 22.0 considerando significativas las diferencias cuando $p<0.05$.

3 I RESULTADOS

Al comparar los niveles de enzimas sanguíneas de animales expuestos al tratamiento magnético agudo y subagudo contra el grupo control no expuesto, no se encontraron efectos del CEM pulsante + CME o al CME estático producido por la máquina, sobre las enzimas FA y TGP. Por su parte, los niveles enzimáticos de TGO mostraron un ligero, pero significativo incremento, en machos expuestos a los campos magnéticos generados por la máquina en la fase de exposición aguda, al compararse con el grupo control no expuesto ($p< 0.05$). Por otro lado, las hembras de este mismo experimento de fase aguda, no mostraron efectos de la exposición magnética en los niveles de TGO con respecto al grupo control no expuesto ($p> 0.05$). En lo concerniente a la fase de exposición subaguda, por el contrario, fue en las hembras expuestas a los campos magnéticos, tanto en los tratamientos de CEM pulsantes + CME y CME, las que presentaron niveles de TGO elevados con respecto al grupo control no expuesto ($p< 0.05$). Los machos, por su parte, no mostraron cambios en los niveles de TGO en ninguno de los tratamientos magnéticos de esta fase de exposición subaguda, al compararse con sus controles no expuestos ($p> 0.05$).

En las figuras de la 1 a 3, se muestran los resultados de la evaluación de cada una de las enzimas sanguíneas estudiadas.
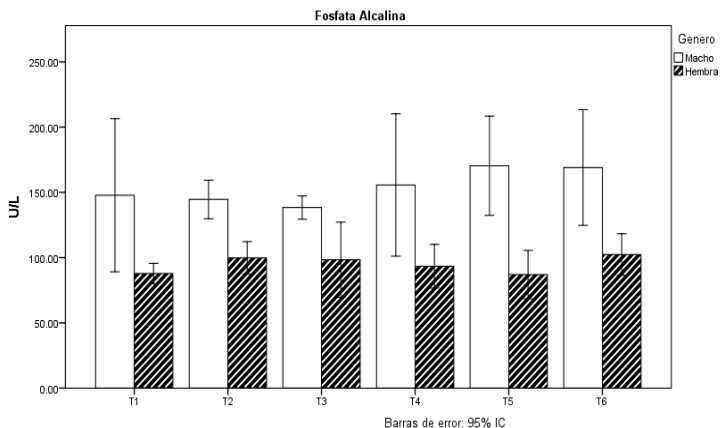
Figura 1. Evaluación de fosfatasa alcalina (FA). (T1) animales expuestos a CEM pulsantes + CME en fase aguda, (T2) exposición a CM estático en fase aguda, (T3) grupo control no expuesto en experimento de fase aguda, (T4) animales expuestos a CM pulsantes + CME en fase subaguda, (T5) exposición a CM estático en fase subaguda, (T6) grupo control no expuesto de la fase subaguda. Las barras representan los valores promedio (media aritmética grupal) en Unidades por Litro (U/L) con sus respectivas desviaciones estándar.
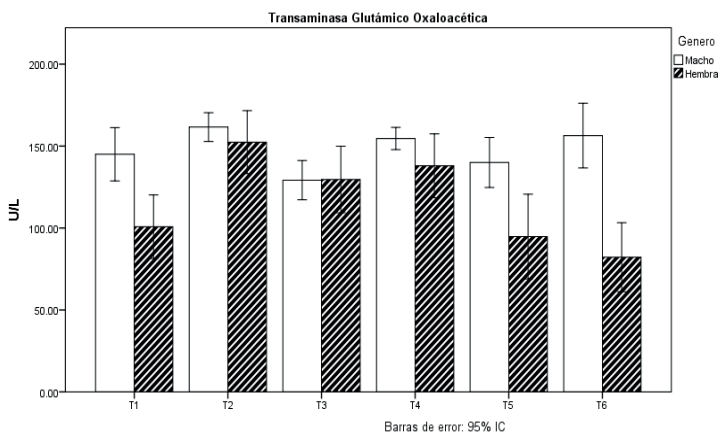
Figura 2 Evaluación de transaminasa glutámico oxaloacética (TGO). (T1) animales expuestos a CEM pulsantes + CME en fase aguda, (T2) exposición a CM estático en fase aguda, (T3) grupo control no expuesto en experimento de fase aguda, (T4) animales expuestos a CM pulsantes + CME en fase subaguda, (T5) exposición a CM estático en fase subaguda, (T6) grupo control no expuesto de la fase subaguda. Las barras representan los valores promedio (media aritmética grupal) en Unidades por Litro (U/L) con sus respectivas desviaciones estándar.
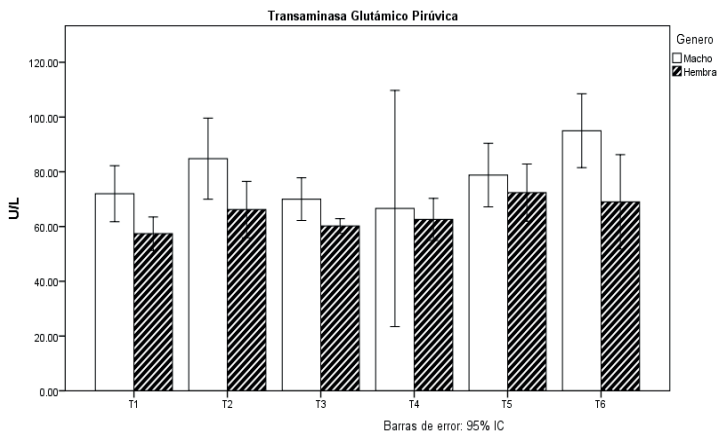
Figura 3. Evaluación de transaminasa glutámico pirúvica (TGP). (T1) animales expuestos a CEM pulsantes + CME en fase aguda, (T2) exposición a CM estático en fase aguda, (T3) grupo control no expuesto en experimento de fase aguda, (T4) animales expuestos a CM pulsantes + CME en fase subaguda, (T5) exposición a CM estático en fase subaguda, (T6) grupo control no expuesto de la fase subaguda. Las barras representan los valores promedio (media aritmética grupal) en Unidades por Litro (U/L) con sus respectivas desviaciones estándar.

4 | DISCUSIÓN

En el presente estudio, no se observó diferencia estadísticamente significativa en los niveles de FA y TGP en animales expuestos a la acción de CEM pulsantes combinados con CME y CME generados por una máquina de uso terapéutico, en comparación con animales no expuestos a la acción magnética de esta máquina. Esto concuerda, en parte, con un estudio previo realizado por Ubeda et al. (1997) ya que estos autores tampoco observaron diferencias significativas en los niveles de estas enzimas al exponer ratas a campos magnéticos de 1.5 mT. En contraste, Zhou et al. (2011) encontraron niveles elevados de FA en osteoblastos humanos *in vitro* que fueron expuestos a CEM sinusoidales de intensidad de 1.8 mT. Por el contrario, Hashish, et al. (2008), observaron una notable disminución en los niveles de FA en ratones expuestos a CEM y CME.

Por otra parte, en nuestro estudio se encontraron ligeras elevaciones ($p< 0.05$) en los niveles de la enzima TGO en machos de la fase aguda de exposición y en hembras de la fase subaguda. Sin embargo, las variaciones encontradas en esta enzima pudieran ser consideradas variables fisiológicas, ya que no mostraron valores superiores o inferiores de los rangos referidos en el Anexo del Manual Sobre el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación de la Canadian Council on Animal Care (Olfert et al., 1993).

Por otra parte, los efectos obtenidos para los niveles de la enzima TGO difieren con el estudio realizado por Sánchez-González, et al. (2007) quienes no encontraron alteraciones en los niveles de TGO en seres humanos expuestos laboralmente, aunque sí encontraron un aumento significativo en los niveles de las enzimas alanina aminotransferasa (ALT),

lactato deshidrogenasa (LDH) y aspartato aminotransferasa (AAT). Más recientemente, Silkstone y Wilson (2016), tampoco encontraron alteraciones en los niveles de TGO con una exposición a CEM de 100 µT a 10 mT en una variedad de frecuencias.

En contraparte, Kula, et al. (2000) reportan que los campos magnéticos de extremadamente baja frecuencia son capaces de incrementar la actividad de enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa, además de incrementar los niveles de malondialdehído (MDA), producto de la peroxidación lipídica.

Por otro lado, existe evidencia que indica que la exposición a campos magnéticos estáticos puede inducir cambios enzimáticos en mamíferos. Así, Salem et al. (2005) observaron que al exponer ratas a un campo magnético estático una hora al día por treinta días, se detectó un aumento en los niveles en suero de LDH, AAT, y ALT. En el mismo estudio, se encontró que al administrar 40 mg/l de zinc por treinta días se previno un aumento en las actividades de las transaminasas (AAT y ALT) en el suero de las ratas, sugiriendo que la suplementación por zinc podría prevenir efectos tóxicos inducidos por campos magnéticos estáticos, probablemente debido a las propiedades antioxidantes de este elemento.

En conclusión, en el presente estudio, se puede asumir que la exposición aguda y subaguda a CEM pulsantes de 120 Hz y CME producidos por una máquina de uso terapéutico, no generaron efectos significativos en los parámetros enzimáticos de FA y TGP de ratas de ambos sexos de la línea Sprague- Dawley, y aunque se observó un aumento en los niveles de TGO, éstos no fueron lo suficientemente elevados para suponer un proceso patológico generado por la exposición a los campos magnéticos probados.

REFERÊNCIAS

Almeida, J. A., Diniz, Y. S., Marques, S. F. G., Faine, L. A., Ribas, B. O., Burneiko, R. C., Novelli, E. L. B. (2002). **The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination**. Environment International, 27(8), 673-679. http://doi.org/10.1016/S0160-4120(01)00127-1

Bassett, C. A. L. (1993). **Beneficial effects of electromagnetic fields**. Journal of cellular biochemistry, 51(4), 387-393.

Ciorba, D., Morariu, V. V. (2001). **Life in zero magnetic field. III. Activity of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase during in vitro aging of human blood**. Electro- and Magnetobiology, 20(3), 313-321.

Davidson J.G. (2001). **System and method for treating cells using electromagnetic-based radiation**. United States Patent Nº 6235251 B1.

Dennery, P. A. (2007). **Effects of oxidative stress on embryonic development. Birth defects research**. Part C, Embryo today: reviews, 81(3), 155-62. http://doi.org/10.1002/bdrc.20098

Diario Oficial de la Federación. (2001). NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, **Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio**. Recuperado a partir de http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=762506&fecha=22/08/2001

Guo, K., Zhang, Y., Fang, X., Fan, P., Shang, S., Fan, F., Wu, H., Man, M., Xie, Y., & Lu, X. (2020). **Effects of acute exposure to ultra-wideband pulsed electromagnetic fields on the liver and kidneys of mice**. Electromagnetic Biology and Medicine, 39(2), 109-122.

Hashish, A. H., El-Missiry, M. A., Abdelkader, H. I., Abou-Saleh, R. H. (2008). **Assessment of biological changes of continuous whole body exposure to static magnetic field and extremely low frequency electromagnetic fields in mice**. Ecotoxicology and environmental safety, 71(3), 895-902.

Ibrahim, N, Hajalan, S, Wajih, A, Khudhair, N, Khalid, A, Thaker, A.A. (2018). **Study the effect of electromagnetic field on some physiological and histological characteristics on the liver of mice**. Asian Jr. Of Microbiol. Biotech. Env. Sc, 20, S41-S46.

Kaur, M., Khera, K. S. (2018). **Impact of cell phone radiations on pituitary gland and biochemical parameters in albino rat**. Octa Journal of Biosciences, 6(1).

Kula, B., Sobczak, A., Kuśka, R. (2000). **Effects of static and ELF magnetic fields on free-radical processes in rat liver and kidney**. Electro-and Magnetobiology, 19(1), 99-105.

Ng, K.H. (2003). **Non-ionizing radiations–sources, biological effects, emissions and exposures**. In Proceedings of the international conference on non-ionizing radiation at UNITEN. Recuperado a partir de http://www.who.int/entity/peh-emf/meetings/archive/en/keynote3ng.pdf

Olfert, E. D., Cross, B. M., Ann McWilliam, A., Olfert, E., Cross Asssistant Director, B., McWilliam, A. (1993). **Guide To The Care And Use Of Experimental Animals**. Volume 1 1993. Canadian Council on Animal Care.

Salem, A., Hafedh, A., Rached, A., Mohsen, S., Khémais, B. R. (2005**). Zinc prevents hematological and biochemical alterations induced by static magnetic field in rats**. Pharmacological reports : PR, 57(5), 616-22. Recuperado a partir de http://rabbit.if-pan.krakow.pl/pjp/pdf/2005/5_616.pdf

Sallam, S. M., Awad, A. M. (2008). **Effect of static magnetic field on the electrical properties and enzymes function of rat liver**. Romanian J Biophys, 4, 337-47.

Sánchez González, Dolores Javier Orjuela Henry, Darío de Jesús Trejo Bahena, Nayeli Isabel Martínez Martínez, Claudia María Ramírez Silva, S. (2007). **Efectos biológicos de campos electromagn**éticos de frecuencia industrial**. Modelo en ratas.** Revista de Sanidad Militar, 61(6), 371-380.

Sies, H. (1986). **Biochemistry of Oxidative Stress**. Angewandte Chemie International Edition in English, 25(12), 1058-1071. http://doi.org/10.1002/anie.198610581.

Silkstone, G., Wilson, M. T. (2016). **A further investigation of the effects of extremely low frequency magnetic fields on alkaline phosphatase and acetylcholinesterase.** Plos one, 11(3), e0148369.

Ubeda, A., Díaz-Enriquez, M., Martínez-Pascual, M. A., Parreño, A. (1997). **Hematological changes in rats exposed to weak electromagnetic fields.** Life Sciences, 61(17), 1651-1656.

Zhou, J., Ge, B., Chen, K., Li, Z., Cheng, G., Wang, J., Ming, L., & Wei, Z. (2011). **Time effect of sinusoidal electromagnetic field on enhancing the maturation and mineralization of osteoblasts in vitro**. Sheng wu yi xue Gong Cheng xue za zhi= Journal of Biomedical Engineering= Shengwu Yixue Gongchengxue Zazhi, 28(6), 1085-1088.

CAPÍTULO 6

Anacardium occidentale L. (ANACARDIACEAE): ANTIBACTERIAL AND ANTIBIOTIC POTENTIATING ACTIVITY

Data de submissão: 12/04/2023 *Data de aceite: 02/05/2023*

Valdilia Ribeiro de Alencar Ulisses
Universidade Regional do Cariri, Departamento de Ciências Biológicas, Crato, CE
http://lattes.cnpq.br/9730825758511373

Adrielle Rodrigues Costa
Universidade Federal do Cariri, Centro de Ciências Agrárias e da Biodiversidade, Crato, CE
http://lattes.cnpq.br/1260333044819626

Henrique Douglas Melo Coutinho
Universidade Regional do Cariri, Departamento de Química Biológica Crato, CE
http://lattes.cnpq.br/3199766197573928

Raimundo Luiz Silva Pereira
Universidade Regional do Cariri, Departamento de Química Biológica Crato, CE
http://lattes.cnpq.br/3243461705511408

Carlos Alonso Leite dos Santos
Universidade Regional do Cariri, Departamento de Ciências Biológicas, Crato, CE
http://lattes.cnpq.br/6096221607515189

Bárbara Rayanne da Silva Teles
Universidade Regional do Cariri, Departamento de Ciências Biológicas, Crato, CE
http://lattes.cnpq.br/6376189864540074

Larisse Bernardino dos Santos
Universidade Regional do Cariri, Departamento de Ciências Biológicas, Crato, CE
http://lattes.cnpq.br/9098753811668164

Luana Vinuto Silva
Universidade Estadual do Ceará, Departamento de Ciências Biológica Iguatu, CE
http://lattes.cnpq.br/5747413933611370

José Weverton Almeida Bezerra
Universidade Regional do Cariri, Departamento de Ciências Biológicas, Crato, CE
http://lattes.cnpq.br/5570296179611652

Maraiza Gregorio de Oliveira
Universidade Regional do Cariri, Departamento de Ciências Biológicas, Crato, CE
http://lattes.cnpq.br/5531655755169344

Ademar Maia Filho
Universidade Regional do Cariri, Departamento de Ciências Biológicas, Crato, CE
http://lattes.cnpq.br/9570480278376163

Magaly Lima Mota
Universidade Regional do Cariri, Departamento de Ciências Biológicas, Crato, CE
http://lattes.cnpq.br/1615061658129263

ABSTRACT: Alexander Fleming discovered the first antibiotic, which was instrumental in saving millions of lives. However, improper use has contributed to the emergence of resistant microorganisms. Medicinal plants are alternatives to drugs, because they have biologically active compounds that can act against microorganisms and even enhance the effects of antibiotics. *Anacardium occidentale* is a species with medicinal properties traditionally used to treat illnesses and, in this work, its antibacterial and antibiotic potentiating activity was evaluated. *A. occidentale* bark collection was carried out in the municipality of Lavras da Mangabeira, Brazil. After cleaning, dehydration and grinding, the material was extracted using ethanol. Antibacterial activity tests were performed with standard strains and clinical isolates. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined and the modulating capacity of the extract with gentamicin, erythromycin and norfloxacin was evaluated. The tests were performed in Brain Heart Infusion culture medium. The results showed that the natural product has no intrinsic antibacterial activity, but when combined with standard drugs it was able to change its activities, intensifying its action in the treatment of infections. These results include the importance of using plant extracts in the treatment of infections, highlighting the importance of further studies to better understand their action, as well as the search for new sources of medication.
KEYWORDS: Drugs, Antibiotics, Resistance, Extracts, Medicinal plants.

Anacardium occidentale L. (ANACARDIACEAE): ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E POTENCIALIZADORA DE ANTIBIÓTICOS

RESUMO: Alexander Fleming descobriu o primeiro antibiótico, que foi fundamental para salvar milhões de vidas. No entanto, o uso inadequado contribuiu para o aparecimento de microrganismos resistentes. Plantas medicinais são alternativas às drogas, pois possuem compostos biologicamente ativos que podem agir contra microrganismos e até mesmo potencializar os efeitos dos antibióticos. *Anacardium occidentale* é uma espécie com propriedades medicinais tradicionalmente utilizadas para tratar enfermidades e, neste trabalho, foi avaliada sua atividade antibacteriana e potencializadora de antibióticos. Coleta de cascas de *A. occidentale* foi realizada no município de Lavras da Mangabeira, Brasil. Após limpeza, desidratação e trituração, o material foi extraído usando etanol. Testes de atividade antibacteriana foram realizados com cepas padrão e isolados clínicos. Determinou-se a concentração mínima inibitória (CIM) e foi avaliada a capacidade moduladora do extrato com gentamicina, eritromicina e norfloxacina. Os testes foram realizados em meio de cultura

Brain Heart Infusion. Os resultados mostraram que o produto natural não possui atividade antibacteriana intrínseca, mas ao ser combinado com fármacos padrões foi capaz de alterar suas atividades, intensificando sua ação no tratamento de infecções. Estes resultados incluem a importância da utilização de extratos vegetais no tratamento de infecções, destacando a importância de mais estudos, para melhor compreensão de sua ação, bem como a busca por novas fontes de medicamentos.
PALAVRAS-CHAVE: Fármacos, Antibióticos, Resistência, Extratos, Plantas medicinais.

1 I INTRODUCTION

In the first half of the 20th century, scientist Alexander Fleming's discovered the first antibiotic, which years later would save the lives of thousands of people throughout the world. This discovery was so important in the world of microbiology that it earned him a Nobel Prize in 1945. In his speech upon receiving his prize, he warned everyone about the possibility of the emergence of microorganisms resistant to such an antibiotic. Unfortunately, his points were neglected, so that antibiotics were used wildly by populations for the treatment of various diseases. Such inappropriate use has resulted in one of the biggest public health problems worldwide, the well-known "bacterial resistance" (SAND, 2020; ABADI et al., 2019; TAN; TATSUMURA, 2015).

This bacterial resistance is quite worrying, as it is estimated that in 2050 there will be around 10 million annual deaths due to infections that are now considered treatable (KRAKER; STEWARDSON; HARBARTH, 2016). The resistance mechanisms of bacteria to chemotherapeutic agents are responsible for their survival and multiplication, which are the enzymatic destruction or inactivation of the drug, changes in the entry of the antibiotic, changes in the target sites of the drug, protection or blocking of the target site and efflux of the antibiotic (ANDERSSON; HUGHES; KUBICEK-SUTHERLAND, 2016; FAIR; TOR, 2014).

Thus, it is evident that the search for new antibiotics is the primary solution. However, the search and discovery of new molecules with a biological effect on pathogenic bacteria has not followed its evolution. As an alternative, there are medicinal plants, which are rich in biologically active compounds, derived from their secondary metabolism (ANAND et al., 2019; MANANDHAR; LUITEL; DAHAL, 2019). Such metabolism originates molecules that have been optimized over thousands of years during the course of evolution, so that they act as defense mechanisms, being able to act against herbivores and even microbes (ANAND et al., 2019). These constituents, in addition to causing death to microorganisms, can affect cellular events in the pathogenic process, so that the ability to develop resistance to products of plant origin becomes more difficult (MAHADY, 2005). In addition to direct biological activity, natural products can act as antibiotic intensifiers against resistant microorganisms (BEZERRA et al., 2020; COUTINHO et al., 2008). This success of medicinal plants is so notorious that the World Health Organization (WHO) lists 21,000 plant species that are used

to treat diseases throughout the world (YUAN et al., 2016).

The Anacardiaceae family is a taxon that includes numerous species of great medicinal importance, with emphasis on the treatment of infections, such as *Mangifera indica* L. (mango), *Pistacia vera* L. (pistachio), *Spondias tuberosa* Arruda (umbu), *Schinus terebinthifolia* Raddi (pink pepper), *Astronium urundeuva* Engl. (aroeira) and *Anacardium occidentale* L. (cashew) (OLIVEIRA et al., 2022; SALESSE et al., 2018; SCHULZE-KAYSERS; FEUEREISEN; SCHIEBER, 2015). The latter is a plant species native to tropical regions of the American continent, and which, in addition to medicinal potential, has global socioeconomic relevance, as its fruits are consumed all over the world. However, despite the popularization of its fruit, its medicinal properties are not restricted to this organ. The bark and leaves are used by the population in the form of teas (infusions and/or decoctions) for the treatment of illnesses. Among the uses, stand out as an analgesic, anti-inflammatory, antipyretic, headache, healing, diabetes, diarrhea, flu, against infections and gastritis (OLIVEIRA et al., 2022; COSTA et al., 2020). Such ethnomedicinal properties attributed to *A. occidentale* may be related to its secondary metabolism. Because it is quite heterogeneous, mainly presenting phenolic compounds, such as flavonoids and tannins (SALEHI et al., 2019).

Having exposed this, it is hypothesized that the bark of *A. occidentale* has biologically active constituents against pathogenic bacteria. Thus, this work aimed to evaluate the antibacterial and potentiating effect of antibiotics from extracts of the stem bark of A. occidentale, as well as to determine its chemical constituents.

2 I MATERIALS AND METHODS

2.1 Collection of Botanical Material

In October 2018, *Anacardium occidentale* barks were collected in the municipality of Lavras da Mangabeira – CE, Brazil (-6º45’12” W and -38º58’18”S). The fertile branches were pressed and dehydrated, being later identified by Professor Dr. João Tavares Calixto-Júnior and deposited at the Herbário Caririense Dárdano de Andrade Lima (HCDAL/URCA), under number 13.690. The collection was carried out during the morning period (09:00±00:30).

2.2 Preparation of extracts

After cleaning in running water to remove residues, the peels (180 g) were dehydrated at 45 °C for 24 hours and crushed. Subsequently, the material was submerged in 1.3 L of 96% ethanol in amber glasses for 72 hours. After exhaustive extraction, the extract was obtained by filtering and concentrating the material in a rotary evaporator coupled to a water bath.

2.3 Antibacterial activity

2.3.1 Bacterial strains, culture media and drugs

To perform antibacterial activity tests, standard bacterial strains and clinical bacterial isolates were used. The standard strains were: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. The clinical isolates were: *Escherichia coli* 06, *Pseudomonas aeruginosa* 24 and *Staphylococcus aureus* 10, with resistance to several drugs ((FERNANDES et al., 2022).

For the execution of the antibacterial assays, the Brain Heart Infusion (BHI) culture medium was used, which was prepared according to the manufacturer's recommendations. In addition, the drugs that were used to evaluate the modulating activity of the A. occidentale extract were gentamicin, belonging to the aminoglycoside class, erythromycin, from the macrolide group, and norfloxacin, a component of fluoroquinolones. These were chosen in order to better assess the capacity of the extract to modulate the action of drugs.

2.3.2 Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined according to the methodology used by Bezerra et al., (2019). For this, a 1,000 µL solution containing 100 µL of inoculum and 900 µL of liquid culture medium (10% BHI) was prepared. This solution was distributed in 96 wells of previously numbered plates, adding 100 µL to each well. Then, 100 µL of extract was added to the first well and serially microdiluted, with concentrations ranging from 512 µg/mL to 1 µg/mL. Finally, the plates were incubated for 24 hours at 37°C to determine the MIC responsible for fully inhibiting bacterial growth.

After incubation, 20 µL of resazurin solution were added to each well for oxidoreductive reactions to take place, signaling possible microbial growth. After 1 hour, the color of each of the wells was evaluated. Those that changed color from blue to red indicate growth while those that remained blue indicate no growth. The color change in the wells allows the identification of the presence or absence of bacterial growth.

2.3.3 Modulator Effect

To evaluate the potentiating capacity of the extract, the methodology proposed by Coutinho et al., (2008) was adopted, which consisted of carrying out MIC tests with several resistant bacteria. After that, the sub-inhibitory concentrations (MIC/8) of the antibiotics were established, which ranged from 512 µg/mL to 1 µg/mL. To carry out the tests, 1,162 µL of 10% BHI were prepared, comprising 150 µL of each inoculated strain and the natural product in volume corresponding to a sub-inhibitory concentration. The control group was prepared with 1,350 μL of BHI (10%) and 150 μL of bacterial suspension. Then, serial microdilution with the antibiotic was performed, with 100 µL of each drug up to the penultimate well. After

incubation (24 hours at 37 °C), the MIC was read, with the addition of 20 µL of resazurin. In this way, it was expected that the results obtained would demonstrate the potentiation capacity of the *A. occidentale* extract.

2.4 Statistical analysis

The results obtained were analyzed using the GraphPad Prism program, version 6, with the aid of the One-way Anova and Tukey's *post hoc* test. The results were considered to be significant when the p value <0.05, which was fulfilled. Therefore, the results obtained were considered relevant and significant.

3 I RESULTS AND DISCUSSION

When evaluating the intrinsic antibacterial effect of the *A. occidentale* extract against standard and multiresistant bacteria, it was possible to observe that the natural product was not able to inhibit bacterial growth at clinically relevant concentrations. So all inhibitory concentrations were >512 μg/mL. Although the bark does not have an antibacterial effect, Doss and Thangavel (2011) demonstrated that the leaves and seeds have antibacterial properties against different bacteria. These include Gram-positive bacteria such as *Micrococcus luteus* and *Staphylococcus aureus*, and Gram-negative human pathogenic bacteria *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*.

In addition to these, Agedah et al. (2010) also identified the antibacterial effect of extracts derived from the leaves of *A. occidentale* on two clinically important pathogens, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Thus, *S. aureus* was more sensitive due to its structural organization, since it does not have an external membrane. While *E. coli* has an external membrane, called the lipopolysaccharide layer attached to its cell wall, which may have prevented the entry of a substantial amount of the extract into the interior of the bacteria. Such antibacterial properties observed for the leaves may be linked to the chemical composition of such organs, since they present polyphenols, anacardic acid and other compounds.

Despite the absence of intrinsic antibacterial activity, the extract when combined with standard drugs was able to alter their activities. An intensifying effect of the drug was observed when associated with oxacillin and norfloxacin against multidrug-resistant strains of *S. aureus* (Figure 01). So the natural product in sub-inhibitory concentration was able to reduce the MIC of the drugs. Making these more effective in treating infections.
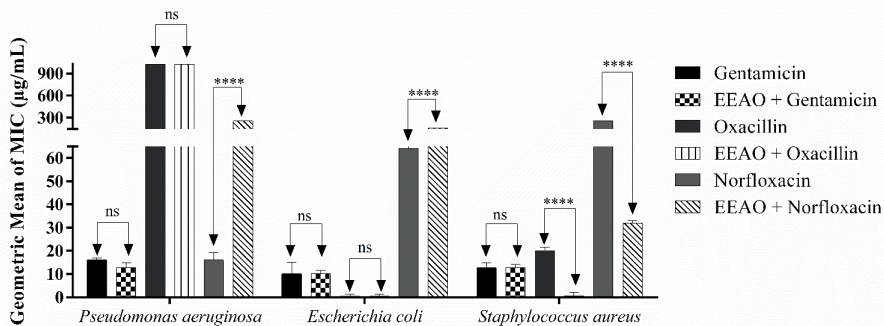
Figure 01: Geometric mean minimum inhibitory concentration (MIC) in µg/ml of ethanolic extract of *Anacardium occidentale* (EEAO) against different multiresistant bacterial strains. ****: p<0.0001.

4 I CONCLUSIONS

Evaluating the *A. occidentale* extract, it was possible to verify that it has no intrinsic antibacterial activity. However, when combined with standard drugs, it was able to change its activities and increase its effectiveness, intensifying its action in the treatment of infections.

REFERENCES

ABADI, A. T. B., RIZVANOV, A. A., HAERTLÉ, T., BLATT, N. L. World health organization report: current crisis of antibiotic resistance. **BioNanoScience**, v. 9, n. 4, p. 778–788, 2019.

AGEDAH, C. E., BAWO, D. D. S., NYANANYO, B. L. Identification of antimicrobial properties of cashew, *Anacardium occidentale* L. (Family Anacardiaceae). Journal of Applied Sciences and Environmental Management, v.14, n. 3, p. 1-3, 2010.

ANAND, U., JACOBO-HERRERA, N., ALTEMIMI, A., LAKHSSASSI, N. A comprehensive review on medicinal plants as antimicrobial therapeutics: potential avenues of biocompatible drug discovery. **Metabolites**, v. 9, n. 11, p. 258, 2019.

ANDERSSON, D. I., HUGHES, D., KUBICEK-SUTHERLAND, J. Z. Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. **Drug Resistance Updates**, v. 26, p. 43–57, 2016.

ALMEIDA BEZERRA, J. W., COSTA, A. R., DE FREITAS, M. A., RODRIGUES, F. C., DE SOUZA, M. A., DA SILVA, A. R. P., DA SILVA, A. R. P., DOS SANTOS, A. T. L., LINHARES, K. V., COUTINHO, H. D. M., SILVA, J. R. L., MORAIS-BRAGA, M. F.B. Chemical composition , antimicrobial , modulator and antioxidant activity of essential oil of *Dysphania ambrosioides* (L .) Mosyakin & Clemants. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 65, n. 4, p. 58–64, 2019.

COSTA, A. R., SILVA, J. R. L., DE OLIVEIRA, T. J. S., DA SILVA, T. G., PEREIRA, P. S., BORBA, E. F. O., BRITO, E. S., RIBEIRO, P. R. V., ALMEIDA-BEZERRA, J. W., CALIXTO JUNIOR, J. T., MENEZES, I. R. A., KAMDEM, J. P., DUARTE, A. E., BARROS, L. M. Phytochemical profile of *Anacardium occidentale* L. (cashew tree) and the cytotoxic and toxicological evaluation of its bark and leaf extracts. **South African Journal of Botany**, v. 135, p. 355–364, 2020.

COUTINHO, H. D. M., COSTA, J. G. M., LIMA, E. O., FALCÃO-SILVA, V. S., SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by mentha arvensis l . and hlorpromazine. **Chemotherapy**, v. 54, n. 4, p. 328–330, 2008.

DOSS V.A., THANGAVEL K. P. Antioxidant and antimicrobial activity using different extracts of *Anacardium occidentale* L. **International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology,** v. 2, n. 3, p. 436-443, 2011.

FAIR, R. J.; TOR, Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. **Perspectives in Medicinal Chemistry**, v. 6, p. PMC.S14459, 2014.

FERNANDES, P. A. S, PEREIRA, R. L. S., SANTOS, A. T. L., COUTINHO, H. D. M., MORAIS-BRAGA, M. F. B., DA SILVA, V. B., COSTA, A. R., GENERINO, M. E. M., DE OLIVEIRA, M. G., DE MENEZES, S. A., SANTOS, L. T. S., ABOLGHASEM, W. P., PORTELA, T. M. A., GONÇALO, M. A. B. F., ALMEIDA-BEZERRA, J. W. phytochemical analysis, antibacterial activity and modulating effect of essential oil from *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Molecules**, v. 27, n. 10, p. 3281, 2022.

KRAKER, M. E. A.; STEWARDSON, A. J.; HARBARTH, S. Will 10 million people die a year due to antimicrobial resistance by 2050? **PLOS Medicine**, v. 13, n. 11, p. e1002184, 2016.

MAHADY, G. Medicinal plants for the prevention and treatment of bacterial infections. **Current Pharmaceutical Design**, v. 11, n. 19, p. 2405–2427, 2005.

MANANDHAR, S., LUITEL, S., DAHAL, R. K. *In Vitro* antimicrobial activity of some medicinal plants against human pathogenic bacteria. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2019, p. 1–5, 2019.

OLIVEIRA, Y. R., DE SOUSA; W. G. M., SILVA; P. H., PACHECO; A. C. L., ABREU, M. C. Anacardiaceae na medicina tradicional de comunidades rurais do piauí, nordeste do brasil. **Ensaios e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde**, v. 26, n. 1, p. 32–42, 2022.

SALEHI, B., GÜLTEKIN-ÖZGÜVEN, M., KIRKIN, C., ÖZÇELIK, B., MORAIS-BRAGA, M. F. B., CARNEIRO, J. N. P., BEZERRA, C. F., SILVA, T. G., COUTINHO, H. D. M., AMINA, B., ARMSTRONG, L., SELAMOGLU, Z., SEVINDIK, M., YOUSAF, Z., SHARIFI-RAD, J., ALI M. A. M., DEVKOTA, H. P., MARTORELL, M., JUGRAN, A. K., NATÁLIA MARTINS, N., WILLIAM C. CHO, W. C. *Anacardium* plants: chemical, nutritional composition and biotechnological applications. **Biomolecules**, v. 9, n. 9, p. 465, 2019.

SALESSE, D., MEDEIROS, F. C., SILVA, C. C. M., LOURENÇO, E. L. B., JACOMASSI, E. Etnobotânica e etnofarmacologia das espécies de amaryllidaceae, anacardiaceae, annonaceae e apiaceae. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 22, n. 3, p.14-28, 2018.

SAND, M. Did Alexander Fleming deserve the nobel prize? **Science and Engineering Ethics**, v. 26, n. 2, p. 899–919, 2020.

SCHULZE-KAYSERS, N., FEUEREISEN, M. M., SCHIEBER, A. Phenolic compounds in edible species of the Anacardiaceae family – a review. **RSC Advances**, v. 5, n. 89, p. 73301–73314, 2015.

TAN, S., TATSUMURA, Y. Alexander Fleming (1881–1955): Discoverer of penicillin. **Singapore Medical Journal**, v. 56, n. 07, p. 366–367, 2015.

YUAN, H., MA, Q., LI, Y., PIAO, G. The traditional medicine and modern medicine from natural products. **Molecules**, v. 21, n. 5, p. 559, 2016.

SOBRE O ORGANIZADOR

EDSON DA SILVA - Possui graduação em Fisioterapia pela Fundação Educacional de Caratinga (2001). Obteve seu título de Mestre (2007) e o de Doutor em Biologia Celular e Estrutural pela Universidade Federal de Viçosa (2013). É especialista em Educação em Diabetes pela Universidade Paulista (2017), em Tecnologias Digitais e Inovação na Educação pelo Instituto Prominas (2020) e em Games e Gamificação na Educação (2020). Realizou cursos de aperfeiçoamento em Educação em Diabetes pela ADJ Diabetes Brasil, *International Diabetes Federation* e Sociedade Brasileira de Diabetes (2018). É docente da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) desde 2006, lotado no Departamento de Ciências Básicas (DCB) da Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde (FCBS). Ministra disciplinas de Anatomia Humana para diferentes cursos de graduação. No Programa de Pós-Graduação em Saúde, Sociedade e Ambiente atua na linha de pesquisa Educação, Saúde e Cultura. Foi vice-coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição de 2019 a 2023, no qual atua nas áreas de Nutrição e Saúde Coletiva. É líder do Grupo de Estudo do Diabetes (GED) credenciado pelo CNPq no Diretório dos Grupos de Pesquisa no Brasil. Desde 2006 desenvolve ações interdisciplinares de formação em saúde mediada pela extensão universitária, entre elas várias coordenações de projetos locais, além de projetos desenvolvidos em Operações do Projeto Rondon com atuações nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil. É membro da Sociedade Brasileira de Diabetes, membro de corpos editoriais e parecerista *ad hoc* de revistas científicas nacionais e internacionais da área de ciências biológicas, ciências da saúde e educação. Tem experiência na área da saúde, atuando principalmente nos seguintes temas: Anatomia Humana; Diabetes *Mellitus*; Biologia; Processos Tecnológicos Digitais e Inovação na Educação em Saúde; Educação, Saúde e Cultura. É Editor da Revista Brasileira de Extensão Universitária (RBEU) e Coordenador do Centro de Referência Diabetes nas Escolas (CRDE) de Diamantina.

ÍNDICE REMISSIVO

A

C

D

E

F

H

I

M

O

P

R

ÍNDICE REMISSIVO

Principais temas da pesquisa em

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS 2

www.atenaeditora.com.br

contato@atenaeditora.com.br

@atenaeditora

www.facebook.com/atenaeditora.com.br

Ano 2023

Principais temas da pesquisa em

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS 2

www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br
@atenaeditora
www.facebook.com/atenaeditora.com.br

Ano 2023